

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平10-508488

(43)公表日 平成10年(1998) 8月25日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E
A 6 1 K 31/015		A 6 1 K 31/015	
31/195		31/195	
31/435		31/435	
35/30	A A B	35/30	A A B
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 168 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願平8-515488	(71)出願人	ダイアクリン・インコーポレーテッド アメリカ合衆国マサチューセッツ州02129チ ヤールズタウン・チャールズタウンネイビ ーヤード・サーティーンズストリート・ビ ルディング96
(86) (22)出願日	平成7年(1995)11月7日	(71)出願人	ザ・マクリーン・ホスピタル・コーポレー ション アメリカ合衆国マサチューセッツ州01278ベ ルモント・ミルストリート115
(85)翻訳文提出日	平成9年(1997)5月8日	(74)代理人	弁理士 小田島 平吉
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 5 / 1 4 4 5 3		
(87)国際公開番号	W O 9 6 / 1 4 3 9 9		
(87)国際公開日	平成8年(1996)5月17日		
(31)優先権主張番号	0 8 / 3 3 6 , 8 5 6		
(32)優先日	1994年11月8日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
(31)優先権主張番号	0 8 / 4 2 4 , 8 5 1		
(32)優先日	1995年4月19日		
(33)優先権主張国	米国 (U S)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 プタ線条細胞、および神経変性疾患による神経的欠乏の処置におけるその使用

(57)【要約】

プタの線条細胞、およびこの細胞を使用して神経変性による神経的欠乏を処置する方法を記載する。プタの線条細胞を、ヒトのような異種移植個体に移植するために適するように修飾できる。例えば、プタの線条細胞を、異種移植個体中の細胞に対する免疫反応を刺激できる細胞表面上の抗原（例えば、MHCクラスⅠ抗原）を変化させて（例えば、抗-MHCクラスⅠ抗体、またはその断片または誘導体との接触による）、個体に導入された時に細胞の拒絶を抑制するように修飾できる。1つの態様では、プタの線条細胞を、受容体個体に感染または疾患を伝播できる生物または物質を本質的に含まないプタから得る。本発明のプタの線条細胞は、この細胞を個体の脳内に導入することにより、異種個体（例えば、癲癇、頭部外傷、発作、筋萎縮性外索硬化症、パーキンソン病、アルツハイマー疾患またはハンチントン病を持つヒト）の脳中の神経変性による神経的欠乏を処置するために使用できる。

## 【特許請求の範囲】

1. 未修飾状態で、異種移植個体中の細胞に対する免疫応答を刺激できる少なくとも1つの抗原を細胞表面上に有し、ここで細胞表面上の抗原は異種移植個体中に導入された時に細胞の拒絶を抑制するように変化させられている、ブタの線条体細胞。

2. 変化させられている細胞表面上の抗原が、MHCクラスI抗原である、請求の範囲第1項に記載のブタの線条体細胞。

3. 異種移植個体中に移植する前に、細胞表面上のMHCクラスI抗原と結合するが、補体を活性化せず、細胞の溶解も誘導しない、少なくとも1つの抗-MHCクラスI抗体またはその断片またはその誘導体と接触させられる、請求の範囲第2項に記載のブタの線条体細胞。

4. 抗-MHCクラスI抗体が、抗-MHCクラスI F(ab')<sub>2</sub>断片である、請求の範囲第3項に記載のブタの線条体細胞。

5. 抗-MHCクラスI F(ab')<sub>2</sub>断片が、モノクローナル抗体PT85のF(ab')<sub>2</sub>断片である、請求の範囲第4項に記載のブタの線条体細胞。

6. 異種移植個体がヒトである、請求の範囲第1項に記載のブタの線条体細胞。

7. 胎児の線条体細胞である、請求の範囲第1項に記載のブタの線条体細胞。

8. ブタ線条の側方神経節隆起から得られる、請求の範囲第7項に記載の単離された線条体細胞。

9. 妊娠の約30日から40日の間の胎児のブタから得られる、請求の範囲第8項に記載のブタの線条体細胞。

10. 表面に結合する抗体、抗体断片、または誘導体を有する、単離さ

れたブタの線条体細胞。

11. 抗体が抗-MHCクラスI抗体である、請求の範囲第10項に記載のブタの線条体細胞。

12. 抗-MHCクラスI抗体が、抗-MHCクラスI F(ab')<sub>2</sub>断片である、請求の範囲第11項に記載のブタの線条体細胞。

13. 抗-MHCクラスI F(ab')<sub>2</sub>断片が、モノクローナル抗体PT85のF(ab')<sub>2</sub>

断片である、請求の範囲第12項に記載のブタの線条体細胞。

14. 表面上の抗原に結合する抗体を有する、妊娠の約30日から40日の間の胎児のブタの側方神経節隆起から得られる、単離されたブタの線条体細胞。

15. ブタの線条体細胞、およびブタの線条体細胞の表面上の抗原に結合する抗体を含んで成る組成物。

16. さらに血管新生因子、神経栄養因子、抗アポトーシス因子、酸化防止剤、および一酸化窒素の生成を抑制する薬剤から成る群から選択される少なくとも1つの薬剤または因子を含んで成る、請求の範囲第15項に記載の組成物。

17. 血管新生因子が、血管内皮増殖因子、血小板由来増殖因子、繊維芽細胞増殖因子、および上皮増殖因子から成る群から選択される、請求の範囲第16項に記載の組成物。

18. 神経栄養因子が、グリア細胞系由来増殖因子、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、ミッドカイン、インスリン様増殖因子IおよびII、インスリン、繊維芽細胞増殖因子、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4/5、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ 、FK506およびシクロスポリンAから成る群から選択される、請求の範囲第1

6項に記載の組成物。

19. 抗アポトーシス因子が、bcl-2遺伝子産物、bcl-xL遺伝子産物、bcl-X $\beta$ 遺伝子産物、crmA遺伝子産物、神経成長因子、血小板由来増殖因子、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼおよびN-アセチルシステインから成る群から選択される、請求の範囲第16項に記載の組成物。

20. 酸化防止剤が、スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、N-アセチルシステイン、ラザロイド、ビタミンC、ビタミンEおよびベータカロチンから成る群から選択される、請求の範囲第16項に記載の組成物。

21. 一酸化窒素の生成を抑制する薬剤が、ガングリオシド、FK506、シクロスポリンAおよびスーパーオキシドジスムターゼから成る群から選択される、請求の範囲第16項に記載の組成物。

22. 単離されたブタの線条体細胞。

23. 胎児のブタの線条から得られる、請求の範囲第22項に記載のブタの線条体細胞。

24. ブタの線条の側方神経節隆起から得られる、請求の範囲第23項に記載のブタの線条体細胞。

25. 妊娠の約30日から40日の間の胎児のブタから得られる、請求の範囲第24項に記載のブタの線条体細胞。

26. 単離されたブタの線条体細胞群。

27. 細胞が胎児のブタの線条から得られる、請求の範囲第26項に記載の細胞群。

28. 細胞がブタ線条の神経節隆起から得られる、請求の範囲第27項に記載の細胞群。

29. 細胞がブタ線条の側方神経節隆起から得られる、請求の範囲第28項に記載の細胞群。

30. 神経祖先細胞を含んで成る、請求の範囲第26項に記載の細胞群。

31. 少なくとも2つの異なる細胞型を含んで成る、請求の範囲第26項に記載の細胞群。

32. 細胞型が神経祖先細胞およびグリア細胞である、請求の範囲第31項に記載の細胞群。

33. グリア細胞が細胞表面糖タンパク質CD44を発現する、請求の範囲第32項に記載の細胞群。

34. 細胞が妊娠の約30日から40日の間の胎児のブタから単離される、請求の範囲第27項に記載の細胞群。

35. 血管新生因子、神経栄養因子、抗アポトーシス因子、抗酸化剤および一酸化窒素生成を抑制する薬剤から成る群から選択される少なくとも1つの薬剤または因子をさらに含んで成る、請求の範囲第26項に記載の細胞群。

36. 血管新生因子が、血管内皮増殖因子、血小板由来増殖因子、繊維芽細胞増殖因子、および上皮増殖因子から成る群から選択される、請求の範囲第35項に記載の細胞群。

37. 神経栄養因子が、グリア細胞系一由来増殖因子、脳一由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、ミッドカイン、インスリン一様増殖因子IおよびII、インスリン、繊維芽細胞増殖因子、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4/5、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ 、FK506およびシクロスポリンAから成る群から選択される、請求の範囲第35項に記載の細胞群。

38. 抗アポトーシス因子が、 $bcl-2$ 遺伝子産物、 $bcl-xL$ 遺伝子産物、 $bcl-X\beta$ 遺伝子産物、 $c-myc$ 遺伝子産物、神経成長因子、血小板由来増殖因子、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼおよびN-アセチルシステインから成る群から選択される、請求の範囲第35項に記載の細胞群。

39. 酸化防止剤が、スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、N-アセチルシステイン、ラザロイド、ビタミンC、ビタミンEおよびベータカロチンから成る群から選択される、請求の範囲第35項に記載の細胞群。

40. 一酸化窒素の生成を抑制する薬剤が、ガングリオシド、FK506、シクロスポリンAおよびスーパーオキシドジスムターゼから成る群から選択される、請求の範囲第35項に記載の細胞群。

41. 非改質状態で、異種移植個体中の細胞に対する免疫応答を刺激できる少なくとも1つの抗原を細胞表面上に有し、ここで細胞表面上の抗原は異種移植個体中に導入された時に細胞の拒絶を抑制するように変化させられている、単離されたブタの線条体細胞群。

42. 変化させられている細胞表面上の抗原が、MHCクラスI抗原である、請求の範囲第41項に記載の細胞群。

43. 異種移植個体中に移植する前に、細胞表面上のMHCクラスI抗原と結合するが、補体を活性化せず、細胞の溶解も誘導しない、少なくとも1つの抗-MHCクラスI抗体またはその断片またはその誘導体と接触させられる、請求の範囲第42項に記載の細胞群。

44. 胎児のブタ線条体細胞を含んで成る、請求の範囲第41項の細胞群。

45. 妊娠の約30日から40日の間の胎児のブタから得られる、請求

の範囲第44項に記載の細胞群。

46. ブタ線条の側方神経節隆起から得られる、請求の範囲第45項に記載の細胞群。

47. 細胞の異種移植受容体に、感染または疾患を伝播できる生物または物質を本質的に含まないブタから単離した、ブタの線条体細胞。

48. 寄生虫、細菌、マイコプラズマおよびウイルスから成る群から選択される少なくとも1つの生物を本質的に含まないブタから単離される、請求の範囲第47項に記載のブタの線条体細胞。

49. 胎児の線条体細胞である、請求の範囲第47項に記載のブタの線条体細胞。

50. 妊娠の約30日から40日の間の胎児のブタから得られる、請求の範囲第49項に記載のブタの線条体細胞。

51. ブタ線条の側方神経節隆起から得られる、請求の範囲第50項に記載のブタの線条体細胞。

52. 少なくとも約30%—約50%の細胞が、線条体細胞を含んで成る、ブタの線条体細胞を含んで成る細胞培養物。

53. 細胞の少なくとも約50%がグリア細胞である、請求の範囲第52項に記載の細胞培養物。

54. ブタの線条体細胞が、ブタの線条の側方神経節隆起から得られる胎児のブタの線条体細胞である、請求の範囲第52項に記載の細胞培養物。

55. 血管新生因子、神経栄養因子、抗アポトーシス因子、抗酸化剤および一酸化窒素生成を抑制する薬剤から成る群から選択される少なくとも1つの薬剤または因子をさらに含んで成る、請求の範囲第52項に記

載の細胞培養物。

56. 異種移植個体に移植する際に、少なくとも1つの神経プロセスを個体脳内の少なくとも1つの領域に広げる、単離されたブタの線条体細胞。

57. 領域が線条体の遠心性標的領域を含んで成る、請求の範囲第56項に記載のブタの線条体細胞。

58. 線条体の遠心性標的領域が、黒質または淡蒼球を含んで成る、請求の範囲第57項に記載のブタの線条体細胞。

59. 非改質状態で、異種移植個体中の細胞に対する免疫応答を刺激できる少なくとも1つの抗原を細胞表面上に有し、ここで細胞表面上の抗原は異種移植個体中に導入された時に細胞の拒絶を抑制するように変化させられているブタの線条体細胞を、異種移植個体の脳内の神経変性領域に導入することを含んで成る、異種移植個体中の脳内の神経変性による神経的欠乏を処置する方法。

60. 線条体細胞が胎児の線条体細胞である、請求の範囲第59項に記載の方法。

61. 神経変性領域が黒質内である、請求の範囲第59項に記載の方法。

62. 個体がハンチントン病を患っているヒトである、請求の範囲第61項に記載の方法。

63. ブタの線条体細胞を個体に導入する前に、細胞表面上の抗原を変化させて個体に導入された時に細胞の拒絶を抑制するために、個体中の細胞に対する免疫応答を刺激できる細胞表面上の少なくとも1つの抗原に結合する少なくとも1つの分子と接触させる、請求の範囲第59項に記載の方法。

64. 変化させられているブタの線条体細胞表面上の抗原がMHCクラスI抗原である、請求の範囲第63項に記載の方法。

65. ブタの線条体細胞を個体に導入する前に、細胞表面上のMHCクラスI抗原と結合するが、補体を活性化せず、細胞の溶解も誘導しない、少なくとも1つの抗-MHCクラスI抗体、またはその断片または誘導體と接触させる、請求の範囲第64項に記載の方法。

66. 抗-MHCクラスI抗体が、抗-MHCクラスI  $F(ab')_2$  断片である、請求の範囲第65項に記載の方法。

67. 抗-MHCクラスI  $F(ab')_2$  断片が、モノクローナル抗体PT85の $F(ab')_2$ 断片である、請求の範囲第66項に記載の方法。

68. 免疫抑制剤を個体に投与することをさらに含んで成る、請求の範囲第59項に記載の方法。

69. 個体に感染または疾患を伝播できる生物または物質を本質的に含まないブタから単離したブタの線条体細胞を、個体の脳内の神経変性領域に導入することを含んで成る、異種移植個体の脳内の神経変性による神経的欠乏を処置する方法。

70. 神経変性領域が基底神経節内である、請求の範囲第69項に記載の方法。

71. 神経変性領域が固体の線条内である、請求の範囲第69項に記載の方法。

72. ブタの線条体細胞が<sup>g</sup>、胎児の線条体細胞である、請求の範囲第69項に記載の方法。

73. 線条体細胞が妊娠の約30日から40日の間の胎児のブタから得られる、請求の範囲第72項に記載の方法。

74. 線条体細胞が<sup>g</sup>、ブタ線条の側方神経節領域から得られる、請求の範囲第73項に記載の方法。

75. 個体がハンチントン病を患っているヒトである、請求の範囲第69項に記載の方法。

76. ブタの線条体細胞を、異種移植個体の脳内の神経変性領域中に導入することを含んで成る、異種移植個体の脳内の神経変性疾患による神経的欠乏の処置する方法。

77. 神経変性の領域が個体の基底神経節内である、請求の範囲第76項に記載の方法。

78. 神経変性の領域が個体の線条内である、請求の範囲第76項に記載の方法。

79. 個体がハンチントン病を患っているヒトである、請求の範囲第76項に記載の方法。

80. ブタの線条体細胞が胎児の線条体細胞である、請求の範囲第76項に記載の方法。

81. ブタの線条体細胞が<sup>g</sup>、ブタの線条の側方神経節隆起から得られる、請求の範囲第80項に記載の方法。

82. 血管新生因子、神経栄養因子、抗アポトーシス因子、抗酸化剤および一酸

化窒素の生成を抑制する薬剤から成る群から選択される少なくとも1つの薬剤または因子を投与することをさらに含んで成る、請求の範囲第76項に記載の方法。

83. 血管新生因子が、血管内皮増殖因子、血小板由来増殖因子、繊維芽細胞増殖因子、および上皮増殖因子から成る群から選択される、請求の範囲第82項に記載の方法。

84. 神経栄養因子が、グリア細胞系由来増殖因子、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、ミッドカイン、インスリン様増殖因子IおよびII、インスリン、繊維芽細胞増殖因子、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4/5、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ 、FK506およびシクロスポリンAから成る群から選択される、請求の範囲第82項に記載の方法。

85. 抗アポトーシス因子が、bcl-2遺伝子産物、bcl-xL遺伝子産物、bcl-X $\beta$ 遺伝子産物、crmA遺伝子産物、神経成長因子、血小板由来増殖因子、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼおよびN-アセチルシステインから成る群から選択される、請求の範囲第82項に記載の方法。

86. 酸化防止剤が、スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、N-アセチルシステイン、ラザロイド、ビタミンC、ビタミンEおよびベータカロチンから成る群から選択される、請求の範囲第82項に記載の方法。

87. 一酸化窒素の生成を抑制する薬剤が、ガングリオシド、FK506、シクロスポリンAおよびスーパーオキシドジスムターゼから成る群から選択される、請求の範囲第87項に記載の方法。

88. 胎児のブタの線条の側方神経節隆起から得た細胞を、ヒト個体の脳内に導入することを含んで成る、ヒト個体のハンチントン病を処置する方法。

89. 細胞がヒト個体の脳内の線条体の神経変性領域に導入される、請求の範囲第88項に記載の方法。

90. 胎児の線条の側方神経節隆起から得た細胞を、ヒト個体の脳内に導入することを含んで成る、ヒト個体の癲癇を処置する方法。

- 9 1. 妊娠の約30日-40日の間の胎児のブタの線条の中央神経節隆起から側方神経節隆起を切開し、そして側方神経節隆起から神経細胞を単離することを含んで成る、胎児のブタ線条の側方神経節隆起から神経細胞を単離する方法。
- 9 2. ブタの幹細胞に由来する、請求の範囲第1項に記載のブタの線条体細胞。
- 9 3. ブタの線条体細胞がブタの幹細胞に由来する、請求の範囲第16項に記載の組成物。
- 9 4. ブタの幹細胞に由来する、請求の範囲第22項に記載のブタの線条体細胞。  
。
- 9 5. ブタの幹細胞に由来する、請求の範囲第47項に記載のブタの線条体細胞。  
。
- 9 6. ブタの線条体細胞がブタの幹細胞に由来する、請求の範囲第76項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

ブタ線条細胞、および神経変性疾患による神経的欠乏の処置におけるその使用

### 発明の背景

パーキンソン病へのL-DOPAの薬理学的投与を除いて、一般的に神経変性疾患には効果的な処置が不足している。これまでの神経変性疾患の研究では、症状は局所的な神経の回転の障害について二次的に起こり、そして全身性のドラッグデリバリーでは効果的に処置できないことを示唆する。その結果、神経変性疾患に関する別の処置が現れた。損傷を受けた神経回路を再構成し、そして欠失したニューロンおよび神経伝達系を置き換えるための努力におけるそのような処置は、遺伝的に操作された細胞（例えば、Breakefield, X.O. ら、(1989) Neurobiol. Aging 10:647-648 ; Gage, F.H. ら (1987) Neuroscience 23:795-807 ; Horellou P. ら、(1990). Eur. J. Neurosci 2:116-:119 ; Rosenberg, M.B. ら (1988) Science 242:1575-1578 ; Wolff, J.A. ら、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9011-9014を参照にされたい）、または胎児細胞（Bjorklund, A ら (1983) Acta. Physiol. Scand. Suppl 1.522:1-75 ; Dunnett, S.B. ら、(1990) 脳の修復(Brain Repair) (Bjorklund, A ら編集) ウェナー-グレン国際シンポジウムシリーズ(Wenner-Green International Symposium Series)56:335-373(マックミラン出版：McMillan Press、ロンドン) ; Isacson, O. ら、(1984) Nature 311:458-460を参照にされたい)の、神経変性の領域への移植を含む。

操作した細胞は細胞株に由来するか、または受容した宿主の繊維芽細胞または他の細胞から成長させ、そして次に脳の特定部位への移植後に

物質を生産、そして分泌するように改質できる。この送達様式に従うことができる神経活性物質は、神経ペプチドおよび化学的伝達物質を含む。例えば研究者の1グループは、遺伝的に操作した神経成長因子-産生ラット繊維芽細胞が、ニューロトキシンを注入する前にラットの線条体に移植された時に、エキサイトトキシン(excitotoxin)-誘導傷害から神経を保護すると報告された生物系を開発した(Schumacher, J.M. ら、(1991) Neuroscience 45(3):561-570)。L-DOPAまたはドパミンを産生するように遺伝的に改質されたラット繊維芽細胞を、ラットの黒質

線条体経路の6-ヒドロキシドパミン傷害に移植した別のグループは、移植した繊維芽細胞が創傷したラットの行動異常を減少させることを報告した(Wolff, J.A. ら、(1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:9011-9014)。遺伝的に操作した細胞の代わりに、脳に移植される細胞は、例えばPC12細胞によるカテコールアミンおよび不死化海馬ニューロンによる神経成長因子のような、それらの重要成分の内存在性放出により選択できる。

神経活性物質を産生、そして分泌するように操作された細胞の移植は、単独で、または胎児神経祖先細胞の脳内の神経変性領域への移植と組み合わせて使用できる。例えば線条体中の神経変性により損傷した機能的連結を修復するために、線条体の神経損失領域中へ移植された細胞は、神経変性の領域からかなり離れて位置する多数の標的構造中に、シナプスとニューロンとの接続性を再度、確立しなければならない。ラットを対象とした線条体間(intrastriatal)の同種移植片の接続の軸索追跡では、求心性および遠心性の両方の接続が、適切な領域中で移植ニューロンと宿主ニューロンとの間で確立されることを示し(Labandeira-Garcia, J.L. ら(1991) Neuroscience 42:407-426; Liu, F.C. ら、(1990) J.Comp.

Neurol.295:1-14; Wictorin, K. ら、(1988) Neuroscience 27:547-562; Wictorin, K. ら、(1989) Neuroscience 30:297-311; Xu, Z.C. ら、(1991) J.Comp.Neurol.303:22-34)、そして宿主-移植接続は電気生理学および超構造分析により実証された。Rutherford, A. ら、(1987) Neuroscience Lett.83:275-281; Xu, Z.C. ら、(1991) J.Comp.Neurol.303:22-34。しかし線条体同種移植片からの遠心性接続の程度は、接続数に関して(Walker P.D. ら、(1987) Brain Res.425:34-44; Wictorin, K. ら、(1989) Neuroscience 30:297-311)、そして遠方標的に対する接続に関して(McAllister, J. ら、(1989) Brain Res.476:345-350; Pritzel ら、(1986) ; Wictorin, K. ら、(1989) Neuroscience.30:297-311; Zhou, H.F. ら、(1989) Brain Res.504:15-30)、限定されている。したがって神経祖先細胞の供給源、および移植から受容体脳組織への遠心性接続および遠方の受容体脳標的への接続を促進または発生を強化する神経移植方法が必要である。

例えば黒質中の神経変性疾患により傷害を受けたドパミン作用性細胞を交換す

るために、ドパミン作用性ニューロン損失の領域への細胞移植は、末端を持つ線条体で飽和し、そしてフィードバック制御系を介してドパミンを産生しなければならない。ドパミンの生合成に作用する酵素を発現するように操作された細胞は、ドパミンを構成的に分泌することが知られている。Kang, U.J.ら、(1993) J. Neurosci. 13(12):5203-5211。ドパミンの構成的分泌は、小胞での有意な保存能力がなく、または分泌レベルでの調節が無いと報告された。Kang, U.J.ら、(1993) J. Neurosci. 13(12):5203-5211; またはFisher, L.J.ら、(1993) Ann. N.Y. Acad. Sci. 695:278-284(取り組んだ問題としてではなく、神経伝達物質の構成的分泌を述べている)も参照にされたい。すなわち、神経伝達物質をフィー

ドバック制御機構を介して生成する神経祖先細胞の供給源の必要性もある。

#### 発明の要約

本発明は、少なくとも部分的にはブタの神経細胞、および特に妊娠発生の特定の段階で単離されたブタの胎児の神経細胞が、異種の個体の脳に移植された時に、宿主個体中の移植細胞と遠い脳の標的との間の遠心性の接続の発生を促進し、そして宿主からの求心性のインプットを受け取るという知見に基づく。さらに、本発明のブタ神経細胞はフィードバック制御系により調節される神経伝達物質の供給源も提供する。

したがって、本発明は異種移植の個体、特にヒト個体に移植するために適するブタの神経細胞または単離されたブタの神経細胞の一群に関する。このブタの神経細胞は未改質（未修飾）の状態です異種の個体中、特にヒトの細胞に対して免疫反応を刺激することができる、少なくとも1つの抗原を細胞表面上に有する。ブタの神経細胞の表面抗原は、異種移植個体に導入された時に細胞の拒絶を抑制するように変化している。1つの態様では、変化した細胞表面抗原は、MHCクラスI抗原である。このMHCクラスI抗原は異種移植個体に移植される前に、少なくとも1つのMHCクラスI抗体またはその断片または誘導体（これは細胞表面のMHCクラスI抗原と結合するが、補体を活性化せず、または細胞の溶解を誘導しない）と接触できる。MHCクラスI抗体の1例は、モノクローナル抗体PT85のMHCクラスI F(ab')<sub>2</sub>断片のようなMHCクラスI F(ab')<sub>2</sub>断片である。

神経変性疾患によるヒトの神経的欠乏の処置の使用に、特に好適なブタの神経細胞は中脳、線条体および皮質細胞である。典型的にはこれら

の細胞は、妊娠発生の選択された段階中に胎児のブタから得る。例えば、妊娠の約20日と30日の間、より好ましくは約24日と30日の間、そしてさらに好ましくは約25日と28日の間、そして一層好ましくは約26日と28日の間、そして最も好ましくは約27日の胎児のブタから得た腹側中脳細胞が、異種の個体、特にヒト個体への移植に適すると決定された。同様に、約20日と50日の間、より好ましくは約30日と40日の間、そして最も好ましくは約31日と38日の間の胎児のブタから得たブタ線条体細胞は、異種移植個体への移植に適すると決定された。1つの態様では、線条体細胞はブタ（例えば胎児のブタ線条体）の神経節隆起（例えば側方の神経節隆起）から得る。妊娠の約30日と50日の間、より好ましくは約31日と40日の間の胎児のブタから得た胎児の皮質細胞は、異種移植個体への移植に適すると決定された。本発明のブタ神経細胞群は、例えば神経祖先細胞、グリア祖先細胞およびグリア細胞から選択される少なくとも2つの異なる細胞型を含むことができる。さらに、本発明の神経細胞は、細胞培養物として成長させることができる。例えば、本発明はブタの中脳細胞（例えば、腹側の中脳細胞）の細胞培養物を含み、ここで少なくとも約1%－5%のブタ中脳細胞がチロシンヒドロキシラーゼを産生する。好ましくは少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約20%、さらに好ましくは少なくとも約30%、一層好ましくは少なくとも約40%、そして最も好ましくは少なくとも約50%以上の細胞培養物中の細胞がブタの中脳細胞である。本発明の別の観点は、単離されたブタの中脳細胞（例えば腹側中脳細胞）であり、異種移植個体へ移植された時にドパミンを産生する。

本発明の別の観点は、単離されたブタ線条体細胞群に関する。そのよ

うなブタ線条体細胞の好適な供給源は、胎児のブタの線条体、そして特に上記の妊娠日齢中に単離された線条体の、神経節隆起、例えば側方の神経節隆起を含む。同様に、ブタ線条体細胞は上記のように改質できる。単離されたブタ線条体の細胞群は、一般的に神経祖先細胞から成るが、例えば神経祖先細胞、グリア祖先

細胞およびグリア細胞から選択される少なくとも2つの異なる細胞型を含んで成ることができる。1つの態様では、グリア細胞は細胞表面の糖タンパク質CD44を発現する。そのような細胞は異種移植個体中に移植され、GABA-作用性の伝達をブタ線条体細胞の移植部位で増強することができる。ブタ線条体細胞(例えば、胎児のブタ線条体細胞、例えば側方神経節隆起から得る)から成る細胞培養物(ここで好ましくは少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約20%、さらに好ましくは少なくとも約30%、一層好ましくは少なくとも約40%、最も好ましくは少なくとも約50%以上がブタ線条体細胞の細胞である)も、本発明の意図するところである。これらの細胞培養物はグリア細胞も含むことができ、例えば少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約20%、さらに好ましくは少なくとも約30%、一層好ましくは少なくとも約40%、最も好ましくは少なくとも約50%以上のグリア細胞である。本発明の別の観点は、異種移植個体中に移植された時に少なくとも1つの神経プロセスを個体の脳の少なくとも1領域に広げる、単離されたブタ線条体細胞を含む。個体の好適な標的領域には、黒質および淡蒼球のような脳の正常な線条体細胞の遠心性標的領域を含む。

本発明のさらなる観点は、単離されたブタ皮質細胞群に関する。そのようなブタ皮質細胞の好適な供給源には、胎児のブタ皮質を含む。ブタ皮質細胞が単離される好適な位置は、基底前脳である。これらブタ皮質

細胞は上記のように改質することができる。ブタ胎児皮質細胞は、少なくとも神経プロセス生長の一部が始まったような妊娠日齢で選択される。好ましくは細胞は短および長距離神経プロセス生長の両方が始まったような妊娠日齢で選択される。皮質細胞群は、例えば神経祖先細胞、グリア祖先細胞およびグリア細胞から選択される少なくとも2つの異なる細胞型を含むことができる。そのような細胞は、異種移植個体に移植されて傷害を受けた、または破壊された皮質細胞と交換される。移植された皮質細胞は、脳内全体に標的-特異的軸索を広げることができる。ブタの皮質細胞(例えば、胎児のブタ皮質細胞)を含んで成る細胞培養物(ここで好ましくは少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約20%、さらに好ましくは少なくとも約30%、一層好ましくは少なくとも約40%、最も好まし

くは少なくとも約50%以上の細胞が少なくとも1つの神経プロセスを有する)も、本発明の意図するところである。本発明のさらなる観点は、異種移植の個体中に移植された時に少なくとも1つの神経プロセスを、個体の脳の少なくとも1つの皮質または皮質下の標的領域に広げる、単離されたブタ標的細胞を含む。脳の典型的な皮質細胞遠心性標的領域には、新皮質、海馬、脳梁、帯状束、内皮膜および大脳脚を含む。

さらに本発明の観点は、感染または病気を細胞の異種移植受容体、例えばヒトに伝播できる生物を本質的に含まないブタから単離した、ブタの神経細胞または神経細胞群に関する。病原体を含まないという場合のブタの病原体のカテゴリーは、寄生虫、細菌、マイコプラズマおよびウイルスを含むことができる。細胞を上記のように改質して、異種移植個体中に導入された時に細胞の拒絶を抑制することができる。本発明のブ

タの神経細胞は、細胞の成長を支持するために適当な培地中で細胞培養物とし成長させることができる。そのような細胞培養物は、血管新生因子、神経栄養因子、抗アポトーシス因子(antiapoptic factor)、抗酸化剤および一酸化窒素の生成を抑制する薬剤から成る群から選択される少なくとも1つの薬剤または因子も含むことができる。血管新生因子の例には、血管内皮増殖因子、血小板-由来増殖因子、繊維芽細胞増殖因子および上皮細胞増殖因子を含む。神経栄養因子の例には、グリア細胞系-由来増殖因子、脳-由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、ミドカイン(midkine)、インスリン様増殖因子IおよびII、インスリン、繊維芽細胞増殖因子、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン4/5、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ 、FK506およびシクロスポリンAを含む。抗アポトーシス因子の例には、bcl-2遺伝子産物、bcl-xL遺伝子産物、bcl-x $\beta$ 遺伝子産物、crmA遺伝子産物、神経成長因子、血小板-由来増殖因子、スーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼおよびN-アセチルシステインを含む。細胞培養に加えることができる抗酸化剤には、スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、N-アセチルシステイン、ラザロイド(lazaroid)、ビタミンC、ビタミンEおよびベータカロチンを含む。一酸化窒素の生成を抑制する薬剤の例に

は、ガングリオシド、FK506、シクロスポリンAおよびスーパーオキシドジスムターゼを含む。さらにブタの神経細胞は、細胞を個体へ導入し易くする送達デバイス中（例えば、シリンジ）に挿入できる。好適な神経細胞型、細胞日齢および細胞起源は、上記の通りである。そのようなブタからブタの神経細胞を単離する方法（この方法では細胞の受容者に感染または病気を伝播できる生物の存在または不在を試験した）、お

および単離した神経細胞も本発明の範囲内である。さらに個体（例えばヒト）の脳内の神経変性を、そのようなブタから単離したブタの神経細胞を個体に導入することにより、処置する方法も本発明の意図するところである。

本発明はまた、本発明のブタの神経細胞（例えば、改質した、または非改質のブタ神経細胞）を、個体（例えばハンチントン病のヒト）の脳内の神経変性の領域（例えば線条体）に移植することにより、異種移植個体の脳内の神経変性による神経的欠乏を処置するための方法も提供する。ブタの神経細胞の移植は、血管新生因子、神経栄養因子、アンチアポプティック因子、抗酸化剤、および本明細書に記載の一酸化窒素の生成を抑制する薬剤から成る群から選択される少なくとも1つの薬剤または因子、ならびに免疫抑制剤（例えば、シクロスポリンA、FK506、RS-61443またはT細胞抗体）を個体に投与することにより行うことができる。

1つの態様では、異種移植個体の脳内の神経変性による神経的欠乏は、ブタの線条体細胞（例えば、ブタの線条体の側方神経節隆起のような神経節隆起から得た線条体細胞のような胎児のブタの線条体細胞）を、個体の脳内の神経変性領域に移植することにより処置される。この方法は、基底神経節の神経変性を処置するために、そして特にハンチントン病に患っているヒトのような個体の線条体中の神経変性を処置するために使用できる。胎児のブタの線条体（例えば、胚日20-50、より好ましくは約30-40日の胚日、そして最も好ましくは約31-38日の胚日）の側方神経節隆起から得たらブタの線条体細胞を、神経変性の部位に移植することが好適である。本発明の神経細胞は、癲癇を処置するために使用することもできる。例えば、本発明の線条体細胞または皮質細胞のようなGA

BA-作用性神経細胞は、癲癇患者の脳（例えば海馬のCA1領域のような海馬中、エントルヒナル(entorhinal)皮質または黒質で起こり得るような、例えば神経変性または癲癇性の焦点領域）に移植できる。

別の態様では、異種移植個体の脳内の神経変性による神経的欠乏は、本発明のブタの中脳細胞を個体の脳内の神経変性領域に移植することにより処置される。この方法は、中脳内の神経変性、そして特にパーキンソン病を患っているヒトのような個体の中脳内の神経変性を処置するために使用できる。ブタの中脳細胞は、妊娠の約20日と30日の間、より好ましくは約24日と30日の間、さらに好ましくは約25日と28日の間、そしてさらに好ましくは約26日と28日の間、そして最も好ましくは約27日に胎児のブタの腹側中脳から得た胎児の腹側中脳細胞であることが好ましい。そのような細胞を異種移植個体の脳内の神経変性部位に移植することができる。

さらに別の態様では、異種移植個体の脳内の神経変性による神経的欠乏は、本発明のブタの皮質細胞を個体の脳内の神経変性領域に移植することにより処置される。この方法は、皮質中の神経変性、そして特に例えば発作、頭部外傷、筋萎縮性外索硬化症、多発性硬化症、ハンチントン病およびアルツハイマー疾患を患っている個体、例えばヒトの皮質中の神経変性を処置するため使用できる。ブタの皮質細胞は、妊娠の約25日と50日の間、より好ましくは約28日と40日の間に胎児のブタの皮質から得た胎児の皮質細胞であることが好ましい。そのような細胞は、異種移植個体の脳内の神経変性部位に移植できる。

本発明はまた、胎児のブタ線条体の側方神経節隆起から細胞を単離する方法も特徴とする。この方法は、妊娠日齢約30-40日の間の胎児のブ

タの線条体の中心軸の神経節隆起から、側方神経節隆起を切開することを含む。

#### 図面の簡単な説明

図1は、異なる日齢の胎児のブタに由来する腹側中脳（VM）細胞の単離後の細胞生存率試験の結果を表す。

図2は、6-ヒドロキシドパミン創傷動物に導入された胎児のブタ中脳移植片を含有するラットに関する、組織学的分析および行動試験の結果を表す。この移植

片は、多数のドパミンニューロン（パーキンソン病を処置するために必要なニューロン）を含み、そしてラットにおいて行動的欠陥を矯正することを示した。移植片を受容したラットの行動を分析するために使用した方法は、以下に“本質的に病原体を含まないブタから得たブタの神経細胞を使用して、異種個体の脳内の神経変性による神経的欠乏を処置する方法”という表題に記載する。

図3は、ブタ、ラットおよびヒトの胚発生の比較を表すグラフである。ブタ、ラットおよびヒトの冠から尻の長さ(crown-to-rump:CRL)対 妊娠日齢をプロットした。これらは同じグラフにプロットするように、誕生時の%総CRLおよび%総妊娠CRLとして表した。ブタ、ラットおよびヒトの妊娠期間は、それぞれ115、21および266日である。矢印は、ハンチントン病について神経細胞収獲に適するブタ、ラットおよびヒトの妊娠日齢を記す。

図4A-4Eは、E50(50日齢)のブタ胎児に由来する各移植片を表し、2、3の神経成分を示している。これはすべての細胞内容(Nissl、図4A)、神経要素(AChE、図4BおよびTH、図4E)、ならびにグリア要素(GFAP、図4CおよびCD44、図4D)について染色し

た、50日齢のドナーに由来する各移植片である。Nissl染色は、移植片の境界を同定し、そしてグリアおよび神経細胞染色を比較すると、移植片の神経染色量が減少していることが分かる。

図5A-5Cは、31日齢のブタ胎児に由来する各移植片を表す。各々の移植片は、31日齢のブタ胎児脳側方神経節隆起(LGE)に由来し、神経およびグリア要素でバランスがとれた移植片を表している。図5Aは、神経マーカーニューロフィラメント70kDに関する移植片染色を表す。図5Bおよび5Cは、それぞれ抗-MHC-Iおよび抗-CD44を用いたグリア要素に関する移植片染色を表す。

図6A-6Dは、胎児ブタ供与体の特徴および切開手順を表す。図6Aは、本明細書に記載した実験中に記録されたブタ胎児の、冠から尻の長さと、予想される妊娠日齢との間の関係を示すグラフである(移植していないものも含む)。図6Bは、E35胎児ブタ脳の図解であり、終脳小胞内の神経節隆起の位置を表す。図6Cおよび6Dは、E35胎児ブタ脳の冠状区分であり、神経節隆起を通る

2つのレベルを表している。中央神経節隆起(MGE)から側方神経節隆起(LGE)を分ける溝は、より前区分(図6C)で明らかに示されており、そして後区分(図6D)で細く消えてる。M=中央神経節隆起; L=側方神経節隆起。尺度棒=200 $\mu$ m。

図7A-7Cは、AChE-染色区分から測定するように、移植された生存胎児ブタ細胞数とその後に生成した8週間後の線条体異種移植片の容量との関係を決定するための用量/反応実験の要約を表す。図7Aは、100,000/50,000細胞比較で、2つの移植片を表す。図7Bは、200,000/10,000細胞比較で、2つの移植片を表す。図7Cは、移植した胎児ブタLGE細胞数と2ヶ月後の異種移植片の容量との間の用量-応答関係を表し

ている。尺度棒=200 $\mu$ m。

図8は、本実験で観察された移植片細胞の回り、および移植片と宿主細胞との間の関係を、略図的に表した要約図解である。移植細胞と宿主の脳構造の間で観察された関係は、右上の箱枠に表し、移植片の軸索およびグリアファイバーの宿主白質管中への優先的な広がり、ならびに移植片軸索と移植片グリアとの移植片の外側での会合を含む。移植片中の種々の細胞型間で観察された関係は、右下の箱枠に示し、AChE-陽性DARPP-陽性、ニューロンリッチゾーンから、GFAP-およびCD44-IRグリア-リッチ領域の分離を含む。移植片のグリア領域に関する移植片軸索の優先性も表される。

図9は、処理無し、後F(ab')<sub>2</sub>処理およびシクロスポリンA(CsA)処理後のブタ線条体異種移植片の生存率を表す移植片である。黒および白スタックカラムは、それぞれ生存および非-生存移植片に対応する。各カラム内の数字は、各カテゴリー中の移植片数を表す。Pearsonカイ自乗分析により、F(ab')<sub>2</sub>対処理無しについて※P<0.005、そしてCsA対処理無しについてT<sub>p</sub><0.001。CsAとF(ab')<sub>2</sub>との間の差異は、統計的に有意ではない。

図10は、F(ab')<sub>2</sub>およびシクロスポリンA(CsA)処理後のブタ線条体移植片容量を表す棒グラフである。白丸は、個々の移植片容量に対応する。カラムは平均値を表す。P<0.05、不對t-試験。

図11は、2匹の異なるサルのPETスキャンを表す。このPETスキャンは、サルが $F(ab')_2$ または非 $F(ab')_2$ -処理の胎児30日のブタ側方神経節隆起細胞の移植を受ける前、および後に作成した。

図12は、サルが非 $F(ab')_2$ -処理の胎児30日のブタ側方神経節隆起細胞の移植を受けた後に、アポモルフィン-誘導運動異常性を表す棒グラフである。

図13は、サルが $F(ab')_2$ -処理の胎児30日のブタ側方神経節隆起細胞の移植を受けた後に、アポモルフィン-誘導運動異常性を表す棒グラフである。

図14A-14Bは、ブタの中脳細胞を移植する前、および移植4-6週間後の間隔で、個々のラットについてプロットしたアンフェタミンが誘導した正味の回転非対称スコア(rotation asymmetry scores)(90分間に、創傷と同じ側の回転から、創傷と反対側の回転を引いた)を表すグラフである。図14Aは、シクロスポリンA(CyA)処理ラット(n=11)を表し、そして図14Bは非-CyA処理ラット(n=11)を表すグラフである。

図15A-15Bは、ラットに移植された19週間後のCyA処理および非-CyA処理ブタ中脳細胞中の生存TH+ニューロンの数の比較(図15A)、およびCyA処理および非-CyA処理ラット中のブタ中脳のグラフ容量の比較(図15B)を提供する棒グラフである。棒はSEMを表す。\*  $p < 0.05$ 、不対t-試験。

図16は、TH+ニューロン生存と、ブタの中脳細胞を移植され、そしてCyA(方形はCyA処置群からの個々のラットを表す)で処置したラット群とブタの中脳細胞を移植され、そしてCyA(丸は非-CyA処置群からの個々のラットを表す)で処置されなかったラット群との間の機能回復の程度の関係を表すグラフである。非一直線回帰分析は、式  $RR = RR_{max} \times N/N_{50} + N$  に適する飽和性関係を明らかにし、ここでRR=回転の減少； $RR_{max}$ =最大の回転の減少；N=TH+ニューロンの数； $N_{50}$ =回転を5

0%減少させるために必要なTH+ニューロンの数( $RR = 104 \times N/[77+N]$ ； $r^2 = 0.642$ )。

図17A-17Hは、Nissl (図17Aおよび17E)、NF70 (図17Bおよび17F) およびCD44 (図17Dおよび17H) で染色したCyA処理ラット (図17A-17D)、および非-CyA処理ラット (図17Eおよび17H) の各々のブタ中脳移植片を通る、隣接対照区分の写真を表す。尺度棒=200 $\mu$ m。

図18A-18Cは、皮質創傷および移植部位ならびに特徴的な創傷および移植片の細胞構造を表す写真 (および概略図) である。

図19A-19Dは、ラット皮質同種移植片中の移植片-宿主境界での、移植片および宿主の接続性を表す写真である (各場合で、移植片は矢印の左側である)。

図20Aおよび20Fは、ブタの皮質異種移植片から生長する軸索およびグリア繊維を表す写真である。

図21A-21Bは、皮質移植片から同側性の脳皮質に広がるNF70-陽性ブタ移植片軸索を表すグラフである。

図22A-22Jは、幾つかの異なる単離物から、胎児腹側中脳細胞の各々の像の位相-蛍光対 (phase-fluorescence pairs) の1組の写真である。細胞はチロシンヒドロキシラーゼ (TH) に対するポリクローナルウサギ抗体、またはニューロン特異的エノラーゼ (NSE) に対するモノクローナルマウス抗体のいずれかで染色し、そして次に蛍光ヤギ抗-ウサギまたはヤギ抗-マウス第二抗体でそれぞれ染色した。染色に使用した抗体は、各対について左上に記す。典型的には、THについて1-5%の細胞が陽性に染色され、そして一般化された脳細胞特異的マーカーである

NSEについてはすべての細胞が染まる。

## 発明の詳細な説明

### I. 本発明の単離細胞および細胞群

#### A. 改質ブタ神経細胞および改質ブタ神経細胞の単離群

本発明は、異種移植受容体、特にヒト個体に導入するために適するブタの神経細胞を特徴とする。本明細書で使用するように句「ニューロン細胞」とは、神経細胞 (すなわち、ニューロン、例えばユニー、ビーまたはマルチ極性ニューロン

）およびそれらの前駆体ならびにグリア細胞（例えば、オリゴデンドロサイト、シュワン細胞およびアストロサイトのようなマクログリア、またはミクログリア）およびそれらの前駆体を含む。用語「前駆体」、「祖先細胞」および「幹細胞」は本明細書では互換的に使用し、そして多能性、すなわち神経細胞を含む多くの異なる細胞型に生育できる細胞を言う。そのような幹細胞を、本発明のブタ神経細胞の供給源として使用でき、すなわち本発明の神経細胞はそのような幹細胞に由来する。本明細書で使用するように、用語「由来（からの）」とは、祖先の多能性幹細胞から発生した、または分化した細胞、または祖先として有する細胞を言う。本発明の細胞を生成するために、このような多能性幹細胞を、典型的には本明細書に簡単に記載するように、そして詳細には1995年5月11日に公開された国際公開第95/12665号明細書（この内容は、引用により本明細書に編入する）記載されているように得られ、そして処理される。

例えば神経細胞が特定細胞の運命に定っていない妊娠日齢中に、メスのブタからブタ胎児を取り出すことができる。1つの態様では、発生の大変初期にブタの胚盤胞または胚から幹細胞を得、そして増殖を促進す

る条件下で培養する。例えばこれらの幹細胞を神経細胞型（例えば、本明細書に記載するような細胞型）に分化促進するレチン酸、神経成長因子のような薬剤を、培養に加えることができる。生成する分化した神経細胞は、本明細書に記載するように受容体個体に移植することができる。

本発明の神経細胞は、ブタ中枢または末梢神経系の任意の位置から得ることができる。非改質状態で、ブタの神経細胞は、異種移植個体中の細胞に対して免疫応答を刺激できる少なくとも1つの抗原を細胞表面上に有する。細胞が異種移植個体中に導入された時、細胞の拒絶反応を抑制するために、細胞表面上の抗原を移植前に変化させる。未変化の状態では、細胞表面上の抗原は、細胞を個体（本明細書では、受容体または受容個体とも言う）に投与した時に、細胞に対して免疫反応を刺激する。抗原を変化させることにより、ブタの神経細胞の正常な免疫的認識が受容体の免疫系細胞により破壊され、そしてさらに、この変化した抗原の状態の「異常な」免疫学的認識は、受容体中でブタ神経細胞に特異的な長期の

非応答性を導くことができる。個体へ細胞を導入する前にブタの神経細胞上の抗原の変化は、細胞の投与に続く宿主の免疫系細胞によるブタの神経細胞の認識の初期相を妨げるらしい。さらに、抗原の変化は免疫学的非応答性または耐容を誘導し、これにより最終的に正常な免疫応答中に外来細胞を拒絶する原因である免疫応答のエフェクター相の誘導（例えば、T細胞生成、抗体生成等）を妨害する。本明細書で使用するように、用語「変化した」とは、抗原の免疫原性を減少する少なくとも1つのブタの神経細胞抗原（1つまたは複数）が作成される変化を包含し、これにより受容体の免疫系による抗原（1つまたは複数）の免疫学的認識を妨げる。

本発明に従い変化する抗原には、異種移植（または同種移植）受容個体中で免疫細胞と相互反応でき、これにより受容体中のブタの神経細胞に対して特異的な免疫応答を刺激する、ブタの神経細胞上の抗原を含む。抗原と免疫細胞との間の相互反応は、間接的な相互作用でよく（例えば、免疫細胞中、反応を誘導する可溶性因子、例えば体液により媒介される）、または好ましくは抗原と免疫細胞上の表面に存在する分子との間の直接的な相互作用である（すなわち細胞-細胞媒介）。本明細書で使用するように、用語「免疫細胞」とは、特定の免疫で役割を果たす（例えば、免疫応答に関与する）、または自然な免疫で役割を果たす細胞を含むことを意図する。免疫細胞の例には、リンパ球のすべての明らかなクラス（ヘルパーT細胞および細胞毒性T細胞のようなTリンパ球、およびBリンパ球、およびナチュラルキラー細胞）、単球、マクロファージ、他の抗原提示細胞、樹状細胞、白血球（例えば、好中球、好酸球および好塩基球）を含む。好適な態様では、抗原はTリンパ球と受容体中で相互作用するものである（例えば通常、Tリンパ球表面上のレセプターと結合する抗原）。

1つの態様では、変化させるブタの神経細胞上の抗原はMHCクラスI抗原である。あるいは、NCAM-1またはICAM-1のような細胞表面上の接着分子を変化させることができる。MHCクラスI抗原のように細胞に対する細胞性の免疫応答を刺激する抗原は、細胞と抗原に結合する分子とを接触させることにより、移植前に変化させることができる。抗原に結合するための好適な分子は、抗

体またはその断片（例えば、抗-MHCクラスI抗体またはその断片、抗-ICA-M-1抗体またはその断片、抗-LFA-3抗体またはその断片、あるいは抗- $\beta_2$ ミクログロ

ブリン抗体またはその断片）である。好適な抗体断片は、 $F(ab')_2$ 断片である。ポリクローナル、またはより好ましくはモノクローナル抗体を使用できる。抗原（例えばMHCクラスI抗原）を変化させるために使用できる他の分子は、抗原に結合するペプチドおよび小さい有機分子を含む。さらに、細胞表面上の同じまたは異なる抗原について、2つ以上の異なるエピトープを変化させることができる。ブタの神経細胞上のMHCクラスI抗原の変化のために、特に好適なモノクローナル抗体はPT85（ベタリナリーメディスンリサーチディベロップメント:Veterinary Medicine Research Development、プルマン、ワシントン州から入手できる）である。MHCクラスI抗原を変化させるために、PT85を単独で使用でき、あるいは各抗体が異なるエピトープに特異的ならば、PT85はMHCクラスI抗原に結合すると知られている別の抗体と組み合わせて使用して、細胞表面上の抗原を変化させることができる。移植のために細胞表面抗原を変化させる適当な方法は、FaustmanおよびCoe(1991)Science 252:1700-1702および国際公開第92/04033号明細書に詳細に記載されている。移植のために細胞上の表面抗原に関する多エピトープを変化させる方法は、国際特許出願公開第95/26741号明細書に詳細に記載されており、これらの内容は引用により本明細書に編入する。

変化した（ここではまた、「改質した（修飾した）」とも言う）ブタの神経細胞は、細胞群を含んで成ることができる。本明細書で使用するような用語「群」とは、2種以上の細胞の群を言う。群のブタの神経細胞は、典型的には脳の選択された領域から得る。本発明のブタの神経細胞群は、形態学的および機能的に均一な細胞を排他的に含む必要はない。細胞群中に神経細胞に加えて非神経細胞の存在は、受容個体への移植に

際して神経細胞の生存および成長を促進することができる。例えば、グリア細胞は神経栄養因子または神経移動のための物質を提供できる。さらにグリア細胞は

、例えば受容体の免疫細胞から神経組織を防護し、これにより神経移植片の拒絶を抑制することにより、神経移植片の長期の生存を可能とする。

本明細書に記載する改質または非改質細胞は、細胞の成長を支持するために適当な培地中で、細胞培養物として成長することができる（すなわちインビトロで成長する細胞群のように）。ブタの神経細胞の成長を支持するために使用できる培地には、Gibco BRL(ゲチスバーグ、メリーランド州)により製造されているような哺乳類細胞培養基を含む。1994年GibcoBRLカタログ&レファレンスガイドを参照にされたい。培地は無血清またはウシ胎児血清のような動物の血清を補充することができる。

移植実験およびヒトの神経変性から生じる神経的欠乏に使用するために、本発明の変化したブタの神経細胞は、異種移植個体中に移植した後に成長、再生および分化が可能となるように発生の適切な段階で単離する。神経変性または神経変性疾患から生じるそのような神経的欠乏には、例えばヒトの頭部外傷、発作、筋萎縮性外索硬化症 (ALS)、多発性硬化症、アルツハイマー疾患、パーキンソン病およびハンチントン病を含む。したがって頭部外傷、発作、ALS、多発性硬化症、ハンチントン病およびアルツハイマー疾患の処置に使用するために好適なブタの神経細胞は、皮質細胞、より好ましくは胎児の皮質細胞であり；パーキンソン病の処置に使用するために好適なブタの神経細胞は、中脳細胞、より好ましくは胎児の中脳細胞であり；そしてハンチントン病の処置に使用するために好適なブタの神経細胞は、線条体細胞、より好ましくは胎児の線

条体細胞である。受容個体に移植された際に、ブタの神経細胞、そして特にブタの皮質細胞、ブタの中脳細胞およびブタの線条細胞の成長、再生および分化を提供するために、最適な供与体が選択される。典型的には本発明の神経細胞は、望ましい移植特性を表すブタの胎児から単離されたブタの胚細胞である。例えば一般的に、繊維芽細胞一様の形態を有する神経細胞は、未熟すぎて収穫および移植できない。神経細胞の好適な形態は、ニューロンに特徴的な正常の形態であり、例えば培養皿のような培養媒体にグリア細胞（これは比較的平らな細胞体を有する傾向がある）ほどは強く接着しない小さな丸い細胞体である。正常なニューロ

ンの形態はまた、一般的に神経突起プロセスの存在を含む。すなわち、少なくとも約1%、より好ましくは少なくとも約10%、さらに好ましく少なくとも約20%、一層好ましくは少なくとも約30%、そして最も好ましくは少なくとも約40%の培養中の神経細胞が、移植のために収穫される時に特徴的なニューロンの形態を有する。本発明の神経細胞培養物は、本明細書に記載するグリア細胞のような、さらなる細胞型も含むことができる。加えて、移植した細胞の生存能を増大させる種々の方法を、本明細書に記載する。

#### a. 移植に適当な日齢の中脳細胞の選択

中脳(mesencephalon)または中脳(midbrain)は、四丘体および大脳脚から成る。各大脳脚の成分は、黒質である。黒質はパーキンソン病のヒト患者に見いだされる主な神経変性領域の1つである。例えば黒質の神経変性疾患を処置するために、ブタの中脳細胞を胎児の供与体であるブタ(swine)(本明細書ではブタ(pig)とも呼ぶ)の原側中脳から単離する。好ましくは、中脳細胞を選択した妊娠日齢で胎児のブタから単離する。

細胞の単離のために選択した妊娠日齢(ブタの全妊娠期間は115日である)は、以下の基準に基づき決定した：単離時の細胞の生存能、異種移植個体(例えばラット)に実験的に誘導した行動の欠乏を矯正するための移植した細胞の能力、および周辺の結合組織に由来する腹側中脳(VM)脳組織を特別に切開する能力。異種移植個体(特にヒト)中に移植するために適する中脳細胞を得るための胎児のブタの好適な妊娠日齢は、約24から25日の間、および29日から30日の間であることが見いだされた。この中脳細胞単離のために好適な妊娠日齢は、図1に示すように実験的に決定した。日齢を変えて胎児由来の細胞単離後の細胞生存能試験結果を表す。これらの実験結果は、発生約29から30日より遅い胎児中の単離VM細胞の生存能に、鋭い下降を示す。さらに50%未満の生存能の細胞は、一般的に生きている移植片を生じない。したがって、29から30日より古い胎児のブタは、ヒトへの移植用の中脳細胞の好適な供給源ではない。約24から25日より若い胎児のブタは、結合組織が所望する脳組織から容易に分離しない。しかし24日より若いブタから得た細胞は、所望により移植に使用

できる。すなわち、ブタの中脳細胞の単離に好適な範囲は、妊娠日齢24から29から30日の間である。ブタの中脳細胞の別の単離に好適な範囲は、妊娠日齢約24から28日の間である。ブタの中脳細胞の単離に、より好適な範囲は、妊娠日齢約26から28日の間である。本発明のブタの中脳細胞の単離に特に好適な胎児発育日齢は、27日である。これは、胎児の冠から尻への長さ（CRL）が18と25mmの間に相当する。そのような組織に由来する移植片（すなわち、ラットへの胎児のブタ組織）を、チロシンヒドロキシラーゼ（これは、ドパミンの合成の速度制限酵素であり、そして

ドパミンニューロンのマーカーである）に対する抗体を用いて染色することにより検定し、これらがドパミンニューロン（パーキンソン病を処置するために必要なニューロン）を含むことを示す。そのような細胞の移植は、実験ラットで行動的欠乏を矯正することが判明した（図2）。ラットの行動的欠乏を分析するために使用する方法は、以下の「本質的に病原体を含まないブタから得たブタの神経細胞を使用して、異種移植個体中の脳の神経変性による神経的欠乏を処置する方法」という表題の下に記載する。

さらに本発明のブタの中脳細胞は、細胞培養物として成長させることができる。例えば、本発明はブタの中脳細胞（例えば、腹側中脳細胞）の細胞培養物を含み、ここで少なくとも約1%－5%のブタの中脳細胞がチロシンヒドロキシラーゼを生成する。チロシンヒドロキシラーゼは、ドパミン合成に関与する周知の酵素であり、そして抗体を用いて検出できる。図22A－22Jは、幾つかの異なる単離物に由来する胎児腹側中脳細胞の、1組の各々の画像の位相－蛍光対の写真を表す。細胞は、チロシンヒドロキシラーゼ（TH）に対するポリクローナルウサギ抗体、またはニューロン－特異的エノラーゼ（NSE）に対するモノクローナルマウス抗体のいずれかで染色し、そして次に蛍光ヤギ抗ウサギまたはヤギ抗マウス第二抗体でそれぞれ染色した。染色に使用した抗体は、各対の左上に記した。典型的には、1－5%の細胞がTHについて陽性に染色され、そしてNSE（これは一般化された脳細胞特異的マーカー）についてはすべての細胞が染色される。好ましくは少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約20%、

さらに好ましくは少なくとも約30%、一層好ましくは少なくとも約40%、そして最も好ましくは少なくとも約

50%以上の細胞培養物中の細胞が、ブタの中脳細胞である。本発明の別の観点では、単離したブタの中脳細胞（例えば、腹側中脳細胞）を含み、これは異種移植個体に移植された時、ドパミンを産生する。インビボのドパミンの産生は、例えば移植片が位置する領域、またはその付近でマイクロダイアリス プローブ(microdialys probe)を使用して測定できる。マイクロダイアリスプローブは、1つのチップに透過性の膜を有する。人工的な脳脊髄液(CSF)をプローブを通して循環させ、このようにしてドパミンが膜を通してプローブ中の人工的なCSF中に入る拡散を可能とする。生成した人工的CSFを、高性能液体クロマトグラフィーカラムに添加し、そしてドパミンを検出できる。

#### b. 移植に適当な日齢の線条体細胞の選択

線条体(striatum)または線条体(corpus striatum)は、脳幹神経節（尾状核および被殻）およびそれらを分ける内包のファイバーから成る小脳半球中の構造である。ブタ以外の動物に由来する線条体細胞は、移植実験に使用され(例えば、Pakzaban, P.ら、(1993) Exp.Brain Res.97:13-22(ラットの線条体細胞)を参照にされたい)、ヒト個体への移植に適するブタの線条体細胞の単離のために、最適な胚の段階が実験的に決定された。例えば、ブタとラットの胎児発生を比較することにより(図3)、ラットの胚の発育はブタとは異なる経過をたどる。しかしラット細胞の単離に関する妊娠日齢に基づいて、実験的に決定したような最適な日齢よりは有意に遅いブタの細胞の単離に関する妊娠日齢を選択するだろう。線条体組織について、ラットの最適な供与体日齢は、発生から14と15日の間であり、これは全妊娠期間の67%に相当する。ブタを対象として同等の段階は、70日である(図3を参照にされたい)。しかし、胎児

のブタから線条体細胞の単離に関して実験的に決定した最適な日齢は、妊娠の約20日から約50日の間であり、より好ましくは約30日から40日の間、さらに好ましくは約31日から約38日の間、そして最も好ましくは約34日から約

36日の間である。約50日、より好ましくは約40日、そして最も好ましくは約38日または39日後には、線条体中の適切な標的組織が確かに切開できず、そして移植後の移植片の品質が劣る（図4A-4Eおよび5A-5Cを参照にされたい）。すなわちヒトへの移植に適する胎児のブタの線条体細胞は、妊娠から好ましくは約20日から約50日の間、より好ましくは約30日から40日の間、さらに好ましくは約31日から約38日の間、そして最も好ましくは約34日から約36日の間の胎児のブタから得る。

ブタの線条体細胞（例えば、胎児のブタの線条体細胞、例えば側方神経節隆起から得た）を含んで成る細胞培養物、ここで少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約20%、さらに好ましくは少なくとも約30%、一層好ましくは少なくとも40%、そして最も好ましくは少なくとも約50%以上の細胞がブタの線条体細胞であるものも本発明の意図するものである。これらの細胞培養物は、グリア細胞も含んでよく、例えば少なくとも約10%、より好ましくは少なくとも約20%、さらに好ましくは少なくとも30%、一層好ましくは少なくとも約40%、そして最も好ましくは少なくとも約50%以上のグリア細胞である。本発明の別の観点には単離したブタの線条体細胞を含むが、これは異種移植個体に移植される際に、少なくとも1つの神経プロセスを個体の脳の少なくとも1つの領域に広げる。本明細書で使用する句「神経プロセス」とは、細胞の任意の伸長を含み、例えばニューロン中の軸索または樹状突起あるいはグリア細胞

の軸索の回りにミエリン鞘を形成する膜状のプロセス、例えば乏枝神経膠である。Kandel, E.R. および Schwartz, J.H. 編集、(1991) 神経科学の原理 (Principles of Neural Science)、第3版、(エルセビア、ニューヨーク) 第14-19頁を参照にされたい。個体の好適な標的領域には、黒質および淡蒼球のような脳の正常な線条体細胞遠心性標的領域を含む。

#### c. 移植に適切な日齢の皮質細胞の選択

大脳皮質は薄く、小脳半球の灰白質の表層を巻き込んでおり、主に5層中に整列したニューロンの細胞体から成る。皮質は伝統的に4つの葉に分割された：前頭葉、頭頂葉、後頭葉および側頭葉である。皮質領域の神経変性による神経的欠

乏を処置するために、ブタの皮質細胞を皮質から、例えば皮質領域が未だ明らかに限定されていない時の発生段階で単離する。したがって本発明の皮質細胞は、任意の皮質の場所から単離できる。基底前脳コリン作用性ニューロンの変性、そして続いて皮質中のアセチルコリン (ACh) の消費は、アルツハイマー疾患の特に顕著な特徴であるので、本発明の皮質細胞を単離するために好適な場所は、ブタの基底前脳である。基底前脳コリン作用性細胞は、妊娠の約20日から30日で、より好ましくは妊娠の約24日から28日、そして最も好ましくは約27日のブタ胎児から単離できる。そのようなブタの細胞は、アルツハイマー疾患個体で失った基底前脳コリン作用性細胞と置き換えるために使用し、そして付随する認識欠乏を減少することができる。好ましくは、皮質細胞を選択した妊娠日齢で胎児のブタから単離する。移植に適当な妊娠日齢の皮質細胞は、神経プロセス形成の程度および広がりに基づき選択できる。一般的に、それらの標的に到達するために最長距離に生長する皮質細胞は、発生の最初に生長プロセスを始め、そして

それらの標的に到達するために短距離に生長する皮質細胞は、生長プロセスを後から始める細胞である。神経プロセス生長は、誕生および誕生後までつづく胎児の発育後期段階まで起こるが、長距離神経プロセス生長は、初期段階（すなわち、胎児発生の約30日）で止まる。したがって移植に適当な妊娠日齢の皮質細胞は、少なくとも神経プロセス生長の一部が始まったような発生段階で、皮質細胞を同定することにより選択できる。好ましくは、細胞は短および長距離神経プロセス生長の両方が始まったが、すべての長距離生長が始まる前に選択される。移植のために適切な妊娠日齢でブタの皮質細胞を選択するために、採用できるパラメーターの例は、以下を含む：（1）皮質細胞は好ましくは、例えば<sup>3</sup>H-チミジン取り込みにより決定できるような、最近有糸分裂した後である。例えば最も暗い核をチミジン適用の後に示す細胞は、分割が適用直後に止まったものであり、そしてそれゆえに最近有糸分裂した後である；（2）皮質細胞は好ましくは細胞中に移動しているか、または最近それらの最終的な運命に到達した；および（3）皮質細胞は好ましくは精巧な神経プロセスには送られず、これは例えば単離

中に別れるとき、細胞死を生じることができる。異種移植個体、特にヒトへの移植に適するブタの皮質細胞を得る、胎児のブタの好適な妊娠日齢は、妊娠の約27日から約50日の間、より好ましくは27日から40日の間、さらに好ましくは27日から39日の間、一層好ましくは27日から38日の間、さらに一層好ましくは27日から27日の間、そして最も好ましくは31日から34日の間であることが判明した。

ブタの皮質細胞（例えば、胎児のブタの皮質細胞）を含んで成る細胞培養物、ここで少なくとも1つの神経プロセスを有する好ましくは少な

くとも約10%、より好ましくは少なくとも約20%、さらに好ましくは少なくとも約30%、一層好ましくは少なくとも約40%、そして最も好ましくは少なくとも約50%以上の細胞が本発明の意図するものである。本発明のさらなる観点では、単離したブタの皮質細胞を含むが、これは異種移植個体に移植される際に、少なくとも1つの神経プロセスを個体の脳内の少なくとも1つの皮質下の標的領域に広げる。脳内の典型的な皮質細胞遠心性標的には、脳梁、帯状束、内包および大脳脚を含む。

B. 単離されたブタ線条体細胞群、個体に移植された時にGABA作用性の伝達を増強させる単離されたブタ線条体細胞群、および単離された皮質細胞群

また本発明は、ブタ線条体から得た単離細胞群も特徴である。線条体の位置および成分は上述する。本明細書で使用するように、用語「単離した」とは、自然な環境から分離された細胞または細胞群を言う。この用語は、自然環境からの粗い物理的分離、例えば供与体動物（例えばブタ）からの取り出し、および例えば解離により細胞と直接接している隣接細胞との関係の変化を含む。用語「単離された」は、組織区分中の、組織区分の一部として培養される、または組織区分の状態に移植される細胞または細胞群を呼ばない。ブタの神経細胞の群を呼ぶために使用する時、用語「単離された」は、本発明の単離された細胞の増殖から生じる細胞群を含む。用語「群」は、2つ以上の細胞の群を含むとする。細胞群中の細胞は、同じ、または異なる供給源（1つまたは複数）、例えば同じブタまたは数頭の異なるブタから得ることができる。しかし、細胞は同じ細胞型である必要

はない。ブタの線条体から得た細胞は、例えば限定するわけではないが神経細胞および神経祖先細胞を含む、種々の

範囲の細胞型を含むことができる。例えば、ブタ線条体細胞（または他の本発明の神経細胞群）の単離された群は、神経細胞、神経祖先細胞、グリア細胞、グリア祖先細胞、上皮細胞および造血細胞を含むことができる。祖先または前駆体細胞は、例えば種々の染色によりコミットされている(committed)細胞から識別できる。例えば神経およびグリア細胞前駆体はビメンチンを発現し、そしてビメンチン-特異的染色を用いて同定でき、一方成熟神経細胞およびグリア細胞は、一般的にビメンチンを発現しない。さらに神経およびグリア細胞前駆体は、神経上皮幹細胞抗原 (NESTIN) について染色することにより、それらのコミットされている対から識別できる。神経およびグリア細胞前駆体染色は、NESTINについて陽性であり、一方それらのコミットされている対は染色されない。Frederiksen, K. ら (1988) J. Neurosci. 8:1144-1151。

1つの態様では、単離されたブタ線条体細胞群は、胎児のブタ線条体から得られ、そして少なくとも神経祖先細胞を含む。胎児のブタの線条体細胞は、好ましくは胎児のブタから、約20日から約50日の間、より好ましくは約30日から40日の間、さらにより好ましくは約31日から約38日の間、そして最も好ましくは約34日から約36日の間で得る。

本発明のブタの線条体細胞は、好ましくは線条体の神経節隆起（すなわち、側方および／または中央神経節隆起）から得られるが、より好ましくはブタの線条体の側方神経節隆起から、本明細書に記載の好適な妊娠日齢で得られる。

1つの態様では、単離されたブタの線条体細胞群は少なくとも2つの異なる細胞型を含む。好ましくはこれらの細胞型は、神経祖先細胞およ

びグリア細胞である。単離されたブタの線条体細胞群に含むことができるグリア細胞の例は、クラスターオブディファレンシエーションファクター44(CD44、H-CAMまたはヘルメス抗原としても知られている)を発現するグリア細胞である。CD44は、滑膜、粘膜およびリンパ節のT細胞／内皮細胞相互作用において、ヒア

ルロン酸塩を細胞表面に結合する (Asher, R. および Bignani, A. (1992) *Exp. Cell. Res.* 203:80-90) ことに関与した、約 90kD の細胞表面糖タンパク質である (Hale, L. P. ら、(1989) *J. Immunol.* 143:3944-3948)。CD44 はグリア細胞のサブセットにより、ヒト CNS 白質中に、および幾つかの灰白質構造の神経網内に発現される。(Vbge1, E. ら、(1992) *J. Neurocytol.* 21:363-373)。ブタの線条体 CD44-免疫反応性グリアは、ブタの線条体細胞が個体に導入された時に、ブタの線条体移植片から周辺組織に線条体の軸索成長を促進する基質および他の影響物質（例えば、神経栄養因子）を提供する。

本発明の別の観点は、異種移植個体に導入された時に GABA-作用性の伝達を移植されたブタの線条体細胞が集まる領域内およびその回りに増強させる、単離されたブタ線条体細胞群に関する。典型的には、GABA（ガンマーアミノ酪酸）-作用性の伝達を増強させるブタ線条体細胞は、側方の神経節隆起に由来する。好適な態様では、ブタ線条体細胞は胎児のブタの線条体に由来する。句「GABA-作用性の伝達を増強する」とは、本発明のブタ線条体が導入された異種移植個体中のガンマーアミノ酪酸の産生が、ブタ線条体細胞以外のブタ神経細胞またはブタ神経祖先細胞が導入された異種移植個体中のガンマーアミノ酪酸の産生よりも多いことを含むものとする。

本発明は、ブタの単離された皮質細胞群、好ましくは例えば本明細書

に記載の妊娠日齢の胎児のブタの皮質細胞が特徴である。用語「単離された」および「群」も、本明細書で説明する。

### C. 本質的に病原体を含まないブタから単離したブタの神経細胞

また本発明は、細胞の異種移植受容体個体、例えばヒト受容体に、感染または病気を伝播できる生物または物質を本質的に含まないブタから単離したブタの神経細胞が特徴でもある。典型的には、ブタの神経細胞を、ヒト病原体を本質的に含まないブタから単離する。例えば、ブタが含まない病原体の例には、限定するわけではないが、以下の病原体のカテゴリーからの 1 つ以上の病原体を含む：寄生虫、細菌、マイコプラズマおよびウイルス。句「本質的に生物を含まない」（本明細書では、「本質的に病原体を含まない」とも言う）とは、細胞が単離され

るブタに関する時、異種移植受容体、例えばヒトに感染または病気を伝播できる量でブタに生物が存在しないことを意味する。実施例VIIは各々、限定するわけではないが本質的に種々の生物を含まないブタの選択法を提供する。そのような生物を本質的に含まないと定められた胎児または出生後のブタを、神経細胞の供給源として使用するまで、適切な条件下で維持する。

本質的に病原体を含まないブタから単離した好適な神経細胞は、皮質細胞、中脳細胞および線条体細胞を含む。これらの細胞を単離する最適なブタの妊娠日齢は、本明細書に詳細に記載する。本質的に病原体を含まないブタから単離したブタの神経細胞は、本明細書に記載されたようにさらに改質して、異種移植個体中に移植した後に、細胞の免疫原性を下げることができる。

## II. 本発明の方法

### A. 本質的に病原体を含まないブタからのブタの神経細胞の単離法

本発明の別の観点は、細胞の異種移植受容体に感染または病気を伝播できる生物または物質を本質的に含まないブタから、神経細胞を単離する方法に関する。この方法に従い、ブタを細胞の異種移植受容体、例えばヒト受容体に感染または病気を伝播できる生物または物質の存在または不在について試験する。そのような生物は、限定するわけではないが、以下の病原体のカテゴリーの1つ以上の病原体を含む：寄生虫、細菌、マイコプラズマおよびウイルス。

神経細胞組織の単離法は、当該技術分野で既知である。例えば固体の神経組織試料を周辺の脳組織から、例えば顕微鏡下の組織切開により切開することができる。次に神経組織試料中の細胞は、機械的手段（例えば切り刻み、および／または連続的なピペットトリチュレーション）により、あるいは化学的手段（例えば酵素）により解離することができる。神経細胞の供給源として本発明の方法に使用するブタには、胎児のブタ（ブタ胎児）および出生後のブタを含む。もし胎児のブタを神経細胞の供給源として使用するならば、本質的に疾病伝播生物を含まないと試験された雄ブタからの精液を、そのような生物を本質的に含まない雌ブタに人工的に注入するために使用する。選択した妊娠日齢（例えば、本明細書に記載の細胞型、例えば皮質細胞、中脳細胞または線条体細胞の妊娠日齢）で、子

宮摘出を適当な滅菌条件下で行い、そしてその後、胎児をそれぞれの個体の羊膜囊から取り出す。その後、適当な神経細胞または組織を適当な滅菌条件下で回収する。

受容体個体に感染または病気を伝播する生物または物質を本質的に含まないブタを、広範な細胞（例えば、神経細胞）の供給源として使用で

きる。本発明の方法に従い、単離できるブタの神経細胞は、例えば本明細書に詳細に記載した皮質細胞、中脳細胞および線条体細胞を含む。本質的に病原体を含まないブタから単離したブタの神経細胞を、本明細書に記載のようにさらに改質できる。

#### B. 改質されたブタの神経細胞を使用して、異種移植個体の脳の神経変性疾患による神経的欠乏を処置する方法

さらに本発明の観点、異種移植個体、特にヒト個体の脳の神経変性疾患による神経的欠乏を処置する方法に関し、この方法ではブタの神経細胞を個体の脳内の神経変性領域に導入する。本明細書で使用するように「神経的欠乏」とは、正常な神経的機能の障害または不在、あるいは異常な神経的機能の存在を含む。ブタの神経細胞は、非改質状態で、異種移植個体中の細胞に対して免疫応答を刺激できる、少なくとも1つの抗原を細胞表面上に有する。異種移植個体に導入された時に、細胞の拒絶を抑制するために、移植前に細胞表面上の抗原を変化させる。本明細書で使用するように用語「導入する」、「移植する(implanting)」または「移植する(transplanting)」は、互換的に使用する。本発明のブタの神経細胞は個体に、細胞を個体の所望する位置に送達する任意の適当な経路により導入される。例えば、個体の脳内に細胞を投与する通常の方法は、脳の神経変性領域中への細胞の直接的な定位的注入による。例えば、Bjorklund, A. ら、(1983) Acta Physiol. Scand. Suppl. 522:1-75を参照にされたい。細胞は、緩衝塩溶液のような生理的に適合性のあるキャリアー中で投与される。ヒト個体の脳内の片側の神経変性による神経的欠乏を処置するために、約1200-2000万個の本発明の神経細胞が神経変性の領域に導入される。両側で起こる脳の神経変性領域を持つヒトには、

約1200—2000万個の本発明の神経細胞が、各神経変性領域へ導入され、全部で2400—4000万個の神経細胞が必要である。約200万個の神経細胞が、各胎児のブタから回収できる。したがって、約2—約12匹の胎児ブタ(約1リットルの胎児のブタ)が、一般的にヒト個体へ導入するための適切な細胞数を得るために使用される。

本発明の細胞は、細胞の個体への導入を容易にする送達デバイス(例えば、注射による)中に挿入することができる。そのような送達デバイスは、細胞および流体を受容体個体の体内に注入するための管(例えばカテーテル)を含む。好適な態様では、この管はさらに針、例えばシリンジのような針を有し、これを通して本発明の細胞を個体の所望の位置に導入することができる。本発明のブタの神経細胞を、そのような送達デバイス(例えばシリンジ)中に溶液状態で挿入できる。あるいは、そのような送達デバイス中に含まれる時、細胞を支持マトリックスに埋め込むことができる。本明細書で使用するように、用語「溶液」は、中に本発明の細胞が生存して留まる、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤を含む。医薬的に許容できるキャリアーおよび希釈剤には、塩溶液、水性緩衝液、溶媒および／または分散媒質を含む。そのようなキャリアーおよび希釈剤の使用は、当該技術分野では周知である。溶液は好ましくは滅菌されており、そして容易にシリンジを利用できる程度の流体である。好ましくは溶液は製造および保存条件下で安定であり、そしてパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等の使用を通して、細菌およびカビのような微生物の混入作用に対して保護されている。本発明の溶液は、本明細書に記載のブタの神経細胞を医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤、および必要に応じ

て上記に列挙した他の材料に包含し、続いて濾過滅菌することにより調製できる。

中にブタの神経細胞が取り込まれ、または埋め込まれる支持マトリックスには、受容体—適合性があり、かつ受容体に無害な生成物に分解するマトリックスを含む。天然および／または合成の生分解性マトリックスは、そのようなマトリックスの例である。天然の生分解性マトリックスには、コラーゲンマトリックスを

含む。合成の生分解性マトリックスには、ポリアンヒドリド、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸のような合成ポリマーを含む。

本発明の方法は、脳内の神経変性から生じた神経的欠乏を表しているヒト個体を処置するために特に有用である。そのような脳の神経変性は、疾患、傷害および／または加齢から生じる。本明細書で使用するように、神経変性には、神経細胞または神経細胞群の形態的および／または機能的異常を含む。限定するわけではないが、形態的および機能的異常には、身体的な衰え、および／または神経細胞の死、神経細胞の異常な成長パターン、神経細胞間の物理的連結における異常、神経細胞による物質（1つまたは複数）（例えば、神経伝達物質）の不十分な、または過剰生産、神経細胞が通常生産する物質（1つまたは複数）を生産できない、異常なパターンまたは異常な時期の物質生産（例えば神経伝達物質）、および／または電気的なインパルスの伝達を含む。神経変性は個体の脳の任意の領域で生じることができ、そしてこれは、例えば頭部外傷、発作、ALS、多発性硬化症、ハンチントン病、パーキンソン病およびアルツハイマー病を含む多くの疾患で見られる。

本発明の1つの態様では、好ましくは妊娠の約31日から38日の間

の胎児のブタの側方神経節隆起から得たブタの線条体細胞を、基底神経節、例えば線条体(striatum)または線条体(corpus striatum)、尾状核および被殻を形成する1つまたは両方の核中で起こる神経変性による神経的欠乏を処置するために、ヒト個体の脳に移植する。ハンチントン病での神経変性は、典型的にはこれら領域中の変性が関与する。妊娠の約31日から38日で胎児のブタの側方神経節隆起から得た線条体細胞も、影響を受けた脳領域、例えば癲癇の個体の癲癇病巣で生じる神経変性による神経的欠乏を処置するために、ヒト個体の脳内に移植できる。限定するわけではないが、そのような領域の例には海馬のCA1領域、扁桃、帯状核、エントリヒナル(entorhinal)皮質および黒質を含む。

別の態様では、好ましくは胎児のブタの腹側中脳から妊娠の約26日から28日、好ましくは約27日に得た中脳細胞を、非線条体領域内で起こる神経変性、例えばパーキンソン病で起こる神経変性による神経的欠乏を処置するために、ヒ

ト個体の脳に移植する。ヒトのパーキンソン病は、主に皮質下構造、特に黒質および青斑に影響を及ぼす。黒質中のドパミンニューロンの損失が特徴であり、これはそれらの主な標的器官として基底神経節を有する。

さらに別の態様では、好ましくは胎児のブタの皮質から妊娠の約27日から40日に得たブタの皮質細胞を、皮質で起こる神経変性による神経的欠乏を処置するために、ヒト個体の脳に移植する。皮質の神経変性は、影響を受けた皮質の領域に依存して、種々の疾患を生じる。例えば、頭部外傷および発作は、皮質のすべての領域および脳幹での神経変性に付随し；ALSは運動皮質および脳幹での神経変性に付随し；ハンチントン病は、線条体および運動皮質での神経変性に付随し；そしてアルツ

ハイマー疾患は、海馬、新皮質、主前頭葉、頂頭葉および前区側頭葉、ならびに扁桃および嗅覚系での神経変性に付随する。

本発明のブタの神経細胞の、ヒト個体の脳（1つまたは複数の神経変性領域）への移植は、傷害を受けた神経回路の再構成および／または失ったニューロンおよび神経伝達物質系の交換を生じる。用語「個体」は、傷害を受けた、加齢の、および／または疾患に関連した神経変性が疑われる哺乳類、特にヒトを含むものとする。また用語「個体」は、免疫応答が同種移植または異種移植細胞に対して現れる哺乳類を含む。個体の例には、霊長類（例えばヒトおよびサル）を含む。本明細書で使用するように「異種移植個体」とは、別の種の細胞が移植される、または移植される予定の個体である。ブタの神経細胞は、傷害を受けた神経回路を再構成し、かつ／または失ったニューロンおよび神経伝達物質系を交換するために、神経変性により引き起こされる神経的欠乏の少なくとも一部の矯正が存在するような適当量で個体に導入される。好適なブタの神経細胞は、胎児のブタから得られ、そして本明細書に詳細に記載した胚の日齢で選択された中脳細胞、線条体細胞および皮質細胞である。

個体の脳内の神経変性領域に導入する前に、ブタの神経細胞をそれらの神経再生能力を増大させ、かつ／または免疫拒絶を抑制するために改質することができる。ブタの神経細胞は、上記に詳細に説明したように、少なくとも1つの免疫原

性細胞表面抗原（例えばMHCクラスI抗原）の変化により、異種移植個体への導入に適當するようにすることができる。同種移植または異種移植の移植受容体中で、移植されたブタの神経細胞の拒絶を抑制し、そして免疫的な非一応答性を達成するために、本発明の方法は、個体に導入される前にブタの線条体細胞表面上の免疫原

性抗原の変化を含むことができる。このブタの神経細胞表面上の1つ以上の免疫原性抗原を変化させる工程は、単独で、または個体に個体のT細胞活性を抑制する薬剤を投与することと組み合わせて行える。あるいはブタの神経細胞移植片の拒絶の抑制は、ブタの線条体細胞表面上の免疫原性抗原の変化前の不在下で、個体のT細胞活性を抑制する薬剤を個体に投与することにより行うことができる。本明細書で使用するように、T細胞活性を抑制する薬剤は、個体のT細胞の除去（例えば封鎖）、またはT細胞破壊、または個体中のT細胞機能の抑制（すなわち、T細胞は個体中に未だに存在するが、それらが増殖できないか、またはエフェクター機能、例えばサイトカイン生産、細胞毒性等を発現または行うことができないような、非一機能的な状態である）を生じる薬剤と定義する。用語「T細胞」とは、成熟末梢血Tリンパ球を包含する。T細胞活性を抑制する薬剤は、未成熟T細胞（例えば胸腺細胞）の活性または成熟化も抑制することができる。

受容体個体のT細胞活性を抑制するために使用する好適な薬剤は、免疫抑制薬である。用語「免疫抑制薬または薬剤」は、正常な免疫機能を抑制または妨害する薬剤を含むことを意図する。好適な免疫抑制薬は、シクロスポリンAである。他の使用できる免疫抑制薬には、FK506およびRS-61443を含む。1つの態様では、免疫抑制薬を少なくとも1つの他の治療剤と組み合わせて投与する。投与できるさらなる治療薬は、ステロイド（例えば、プレドニソン、メチルプレドニソンおよびデキサメタソンのようなグルココルチコイド）および化学療法剤（例えば、アザチオプリンおよびシクロホスホアミド）を含む。別の態様では、免疫抑制薬をステロイドおよび化学治療薬の両方と組み合わせて投与する。適當

な免疫抑制薬は市販されている（例えば、シクロスポリンAはニュージャージー

州、イーストハノーバーのサンドス社：Sandoz, Corp. から入手できる）。

免疫抑制薬を、投与経路に適合する組成で投与する。適当な投与経路は、静脈注射（単回注入、多回注入または時間をかける静脈点滴のいずれか）、腹腔内注射、筋肉内注射および経口投与を含む。静脈注射には薬剤を、滅菌されており、かつシリンジを利用できる生理的に許容できるキャリアーまたは希釈剤（例えば、緩衝塩溶液）に溶解できる。薬剤の分散液も、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中に、および油中に調製できる。免疫抑制薬に便利な投与経路およびキャリアーは、当該技術分野で周知である。例えばシクロスポリンAは、塩溶液中で静脈投与でき、またはオリーブ油もしくは他の適当なキャリアーまたは希釈剤中で経口、腹腔または筋肉投与できる。

免疫抑制薬は、所望の治療効果を達成するために十分な投与量で受容体個体に投与される（例えば、移植した細胞の拒絶反応を抑制する）。一緒に投与できる免疫抑制薬および他の薬剤（例えば、ステロイドおよび化学療法剤）の投与量範囲は、当該技術分野で周知である（例えば、Freedら、New Engl.J.Med. (1992) 327:1549; Spencerら、(1992) New Engl.J.Med. 327:1541; Winderら、(1992) New Engl.J.Med. 327:1556; Lindvallら、(1992) Ann.Neurol. 31:155; および Lindvallら、(1992) Arch.Neurol. 46:615を参照にされたい）。ヒトを処置するために適当な免疫抑制薬の好適な投与量範囲は、1日あたり約1-30mg/kg体重である。シクロスポリンAの好適な投与量範囲は、1日あたり約1-10mg/kg体重、より好ましくは1日あたり約1-5 mg/kg体重である。投与量は受容体

個体の血清中の免疫抑制薬の最適レベルを維持するために調整できる。例えばヒト個体中のシクロスポリンAについて投与量は、約100-200ng/mlの好適な血清レベルを維持するために調整できる。投与量の値は、個体の疾患状態、年齢、性別および体重のような因子に従い、変動してよい。投薬は個人の必要性、および投与し、そして組成物の投与を管理する人の専門的判断に従い、最適な治療反応を提供するように時間をかけて調整され、そして本明細書で設定した投与量の範囲は例示のみであり、そして特許請求する組成物の範囲およびプラクティスを限定するものではない。

本発明の1つの態様では、個体中の移植細胞の耐容を誘導するために十分な時間、免疫抑制薬を一時的に個体に投与する。免疫抑制薬の一時的な投与は、長期の移植片—特異的耐容を移植片受容体に誘導すると判明した(Brunsonら、(1991) Transplantation 52:545;Hutchinsonら、(1981)Transplantation 32:210;Greenら、(1979) Lancet 2:123;Hallら、(1985) J.Exp.Med.162:1683を参照にされたい)。薬剤の個体への投与は、細胞を個体に移植する前に始めることができる。例えば、薬剤投与の開始は、移植の数日前(例えば1—3日)であることができる。あるいは薬剤投与は、移植当日または移植の数日後(一般的に3日より長くはない)に始めることができる。薬剤の投与は、薬剤の投与が終了した時に、受容体により供与体細胞が続いて受け入れられるように、供与体細胞—特異的耐容を受容体中に誘導するために十分な時間、続けられる。例えば、薬剤は短くても移植後3日間、または長くても3カ月投与できる。典型的には、薬剤は移植後少なくとも1週間、しかし1カ月よりは長くなく投与する。個体中に移植した細胞に対する耐容の誘導は、

免疫抑制薬の投与を止めた後に移植細胞が連続して受け入れられることにより示される。移植組織の受容は、形態学的に(例えば、移植組織の検査またはバイオプシーによる皮膚の移植片を用いて)、あるいは移植片の機能的活性の評価により測定できる。

個体中でT細胞活性を抑制するために使用できる別の種類の薬剤は抗体またはその断片または誘導體であり、これは受容体中のT細胞を消費または封鎖する。個体中に投与された時にT細胞をインビボで消費または封鎖できる抗体は、当該技術分野で周知である。典型的には、これらの抗体はT細胞表面上の抗原に結合する。ポリクローナル抗血清、例えば抗—リンパ球血清を使用できる。あるいは、1つ以上のモノクローナル抗体を使用できる。好適なT細胞消費抗体には、T細胞表面上のCD2、CD3、CD4またはCD8に結合するモノクローナル抗体を含む。これらの抗原に結合する抗体は、当該技術分野で周知であり、そして市販されている(例えば、アメリカンタイプカルチャーコレクション)。ヒトT細胞上のCD3に結合するために好適なモノクローナル抗体は、OKT3(ATCC CRL8001)である。抗

体のT細胞上の表面抗原との結合は、個体中のT細胞の封鎖を容易にし、かつ／または内因性の機構により個体中のT細胞の破壊を容易にできる。あるいは抗体がT細胞に結合した時にT細胞の破壊を容易にするために、T細胞表面の抗原に結合するT細胞-消費抗体を、トキシン（例えばリシン）または他の細胞毒性分子（例えば放射性同位体）に結合できる。本発明に使用できる抗体の生成に関するさらなる詳細は、国際特許出願公開第95/26740号明細書を参照にされたい。

受容体個体中のT細胞活性を抑制するために使用できる別の種類の抗体は、T細胞増殖を抑制する抗体である。例えば、IL-2のようなT細胞

増殖因子に対する抗体、またはIL-2レセプターのようなT細胞増殖因子レセプターは、T細胞の増殖を抑制できる（例えば、DeSilva,D.R.ら、(1991)J.Immunol 147:3261-3267を参照にされたい）。したがって、IL-2またはIL-2レセプター抗体は、移植された細胞の拒絶を抑制するために受容体に投与できる（例えば、Woodら、(1992) Neuroscience 49:410を参照にされたい）。さらにIL-2およびIL-2レセプター抗体の両方をT細胞活性を抑制するために同時に投与するか、または別の抗体と共に投与できる（例えば、T細胞上の表面抗原に結合する）。

受容体中でT細胞を消費、封鎖または抑制する抗体は、移植に際して細胞の拒絶を抑制するための投与量および適当な期間で投与できる。抗体は好ましくは、医薬的に許容できるキャリアーまたは希釈剤中（例えば、滅菌塩溶液で静脈に投与される。抗体投与は、移植前に始め（例えば、移植の1-5日前）、そして所望の効果を達成するために移植後も毎日続けることができる（例えば、最高移植の14日後まで）。抗体をヒト個体へ投与するための好適な範囲は、1日あたり約0.1-0.3mg/kg体重である。あるいは単回の高投与量の抗体（例えば、投与量約10mg/kg体重のボラス）をヒト個体に、移植日に投与できる。抹消血からT細胞を消費する抗体処置の効果は、抗体処理前および後の個体から採血した血液試料中のT細胞計数を比較することにより定められる。投薬は個人の必要性、および組成物を投与し、そして管理する人の専門的判断に従い、最適な治療反応を提供するように時間をかけて調整される。本明細書で説明した投与量の範囲は例示のみであり、そして特許請求する組成物の範囲またはプラクティスを限定する

ものではない。

別の態様では、例えば神経再生能力を増大するために、本発明のブタ

の神経細胞（例えば、神経細胞、神経祖先細胞）を遺伝的に工作して、外来分子（例えば、神経栄養因子、神経伝達物質または神経保護剤）を発現および／または分泌するようにする。さらに、非改質または改質したブタの神経細胞を、有用な機能を行うように遺伝的に改質した別の種類の細胞（例えば、ブタの線条体に由来する他の細胞、または他の起源に由来する細胞）と一緒に、異種移植個体の脳に導入できる。例えば、個体の脳内の神経変性領域中のニューロンの成長を促進するために、ブタの線条体に由来する神経祖先細胞を、例えば神経栄養因子を分泌するように改質された別の細胞と一緒に神経変性の領域へ移植できる。導入遺伝子の個体脳へのキャリアーとして作用する細胞の例は、繊維芽細胞(Fisher, L.J.ら、(1991) Neuron 6:371-380; Rosenberg, M.B.ら、(1988) Science 242:1575-1578)、アドルナル クロマフィン細胞(Cunningham, L.A.ら(1991)Brain Res. 561:192-202)、星状細胞(Suhr, S.T.およびGagem F.H.(1933)Arch. Neuro 1.50(11):1252-1268)、および筋芽細胞(Jiao, S.ら、(1993) Nature 362:450-453; Jiao, S.ら、(1992) Brain Res. 575:143-147; Jiao, S.ら、(1992) Hum. Gene Ther. 3:21-33)を含む。例えば、繊維芽細胞、グリア細胞のような細胞も、レトロウイルス含有遺伝子（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子）を運ぶために使用でき、その遺伝子産物は、それらの成長を抑制するために細胞（例えば腫瘍細胞）を標的とするための他の治療薬または薬剤（例えば、ガンシクロビア）の標的である。Culver, K.ら(1992)Science 256:1550-1552; Chen, S-Hら、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3957。あるいは、例えばインプラントの成長および発育を増強させるための神経栄養因子を生成するために、神経変性領域に移植されるブタの線条体に由来する

祖先細胞それ自体を遺伝的に改質する。

神経変性を本発明の方法、または本発明の方法と組み合わせて使用することにより処置できる幾つかのメカニズムがある。例えば、新しい機能は、表現型が有

用な方法で標的細胞（例えば、傷害をうけた神経細胞）に導入できる。新たな機能は、標的細胞と強固な連結または他の接触を確立できる遺伝的に改質した細胞（例えば、ブタの線条体細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞等）を導入することにより、そのように不完全な標的細胞（例えば、傷害をうけた神経細胞）中で発現することができる。そのような接触の中には、代謝的に重要な小分子を1つの細胞から別の細胞へと効率的に拡散させ、受容体細胞の表現型の変化を導くことができる、と知られているものもある。Lowenstein, W.R. (1979) Biochim. Biophys. Acta. 560:1-66。この過程は「代謝協同」と呼ばれ、そして繊維芽細胞とグリア細胞との間で起こることが知られている。Gruber, H.E. ら、(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6662-6666。この種の協同性は、CNS-障害後のコリン作用性神経死のNGF-媒介保護の場合のように、CNS細胞を用いて実証された。Hefti, F. (1986) J. Neurosci. 6:2155; Williams, L.R. ら、(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9231-9235。

本発明の方法を用いることにより神経変性を処置できる別のメカニズムには、近くの標的細胞により取り込まれ、そして使用されることができ拡散性の遺伝子産物を発現または分泌できる、さらに別の遺伝的に改質した細胞の生成を含む。神経変性疾患の動物モデルを対象として行われた1つの方法は、組織移植を通して脳内の神経伝達機能を増加させることである。例えば繊維芽細胞系が、コリンアセチルトランスフェラーゼを発現するように改質された。改質された繊維芽細胞はラットの海

馬中に移植され、ここで移植後、繊維芽細胞はアセチルコリンを生産そして放出し続ける。Fisher, L.J. ら、(1993) Ann. N.Y. Acad. Sci. 695:278-284。繊維芽細胞もチロンシヒドロキシラーゼ(チロンシをL-DOPAに転換する)を生産するように遺伝的に改質され、そしてすでに6-ヒドロキシドパミン損傷をもつ受容体ラットの線条体に移植された。移植された繊維芽細胞は、宿主の線条体中でチロンシをL-DOPAに転換し続け、そして行動的測定を通して評価されるように、宿主の脳に影響を与え続ける。Fisher, L.J. ら (1991) Neuron 6:371-380。

神経変性疾患の動物モデルを対象として行われた別の方法は、神経生長因子(N

GF)(これはニューロンの成長および発生を維持し、損傷が誘導する死を防ぎ、そして軸索発生および再生の成長を神経変性領域に誘引する)のような神経栄養因子を送達することである。繊維芽細胞は、NGFを分泌するように改質できる。これらの繊維芽細胞がラットのような個体の線条体に導入された時、これらはエキサイトトキシン(excitotoxin)-誘導損傷からニューロンを保護する。Schumacher, J.M.ら (1991) Neuroscience 45(3):561-570。本発明のブタの線条体細胞およびブタの線条体細胞と一緒に移植される他の細胞型は、さらにグリア細胞系-由来神経栄養因子(GDNF)(中脳ドパミン作用性ニューロンを強化する有力な神経栄養因子)を発現するように遺伝的に操作できる(Leu-Fen.H.ら、(1993) Science 260:1130-1132)。

個体に導入される細胞は、移植前にインビトロで遺伝的に改質されるか、または代わりに細胞は移植後インビボで直接改質できる。Suhr, S.T.およびGage, F.H. (1993) Arch. Neurol. 50(11):1252-1268; Gage F.H.ら (1987) Neuroscience. 23(3): 795-807。種々の方法がブタの神経細胞の

ような供与体細胞を、受容体個体へ移植する前に遺伝的に改質するために利用可能である。これらの方法には直接的なDNA取り込み(トランスフェクション)、およびウイルスベクター(レトロウイルス、ヘルペスウイルス、アデノウイルスおよびアデノ-随伴ウイルスベクターのような)を用いた感染を含む。Shur, S.T.ら、(1993) Arch. Neurol. 50(11):1252-1268。トランスフェクションは沈殿したDNAのエンドサイトーシス、DNAを含むリポソームの融合またはエレクトロポレーションにより行うことができる。Suhr, S.T.ら、(1993) Arch. Neurol. 50:1252-1268。供与体細胞をトランスフェクションする別の方法は、「遺伝子銃(gene gun)」の使用を介する。この方法では、微細なDNA-被覆粒子を焦点管を通して高速度で加速し、そしてインビトロ(Klein, R.M.ら、(1992) Biotechnology 24:384-386; Zelenin, A.V.ら、(1989) FEBS Lett. 244:65-67)またはインビボ(Zelenin, A.V.ら、(1991) FEBS Lett. 280:94-96)の細胞中に「打つ」または注入する。この細胞は創傷部位の回りに近ずき、そして粒子上の細胞に運ばれる遺伝子を発現する。

レトロウイルスベクターは、典型的に外来遺伝子を細胞中、特に哺乳類細胞中に導入および発現する最も効率的な、かつ特徴が明らかな手段を提供する。これらのベクターは大変広範な宿主および細胞型の範囲を持ち、合理的に良く理解されたメカニズムにより宿主ゲノムの不規則部位に組み込まれ、遺伝子を安定かつ効率的に発現し、そしてほとんどの条件下でそれらの宿主細胞を殺したり、または明らかに害を与えることはない。レトロウイルスベクターの調製法は、文献に広く記載され (Suhr, S.T. および Gage, F.H. (1993) Arch. Neurol. 50(11):1252-1258; Ray, J. および Gage, F.H. (1992) Biotechniques 13(4):598-603; Anderson, W.F. (1

984) Science 226:401-409; Constantini, F. ら、 (1986) Science 233:1192-1194; Gilboa, E. ら (1986) Biotechniques 4:504-512; Mann, R. ら、 (1983) Cell 33:153-159; Miller, A.D. ら (1985) Mol. Cell. Biol. 5:431-437; および Readhead, C. ら、 (1987) Cell 48:703-712) 、そして現在では多くの研究室で共通に使用されている。

他の遺伝的に改質された細胞の生成法は、国際特許出願公開第95/27042号明細書に詳細に記載されている。その出願内容は、引用により本明細書に編入される。

#### C. ブタ線条体細胞を使用する異種被験体の脳の神経変性による神経学的欠損の治療方法

異種被験体の脳の神経変性による神経学的欠損の治療のために本明細書で開示されるひとつの方法は、当該被験体の脳の神経変性領域へのブタ線条体細胞の導入を包含する。本発明の方法での使用で好まれるブタ線条体細胞は、線条体の外側神経節隆起から得られるブタ胚線条体細胞である。線条体の外側神経節隆起が得られるブタ胚は、外側および内側の神経節隆起が形態学的に互いに区別され得る妊娠齢のものである。一般には、これらの領域は、妊娠約20日と約50日、より好ましくは約30日と40日、さらにより好ましくは約32日と約38日、そして最も好ましくは約34日と約36日の間のブタ胚で形態学的に明確である。

ブタ胎児の脳から外側神経節隆起を切開するには、胎児を断頭し、そして脳を正中矢状切開により頭蓋から摘出する。傍矢状切開を各半球の背面に沿って創造し、脳側室の腹側外側壁に内側および外側神経節隆起を露出させる。この切開はその後円周状に完遂され、半球の腹側外側壁（神経節隆起をもつ）を脳の残部よ

り引き離す。半球の引き離された壁の外側（皮質性）の表面を、その後、しっかりした支持体（例えば切開

用皿）で平らにならし、それにより内部表面上に神経節隆起が露出する。内側隆起を切除する。今や脳側室の引き離された壁上に単離された外側神経節隆起をその後、その底部に沿って切除（例えば湾曲した微小ハサミで）し、そして分離用の適切な容器（例えばペトリ皿）に移す。

外側神経節隆起が内側神経節隆起から分離されれば、外側神経節隆起細胞を、ブタ胎児線条体細胞の単離に適する条件下で分離する。これらの条件下では、細胞が分離される溶液の成分は、生存可能な線条体細胞の最も高いパーセントを維持するように調整される。例えば、好まれる分離溶液では、カルシウム、マグネシウム、重炭酸塩およびフェノールレッドを含まないハンク (Hank) の平衡塩溶液が使用される。これらの成分は分離後に生存可能な細胞のパーセントを低減させることが見出されているためである。加えて、分離の間に細胞上に置かれるずり応力 (shear strain) の量を低減するための予防措置が取られる。これらの予防措置は、分離の間の気泡の創製を最小限とすること、および、ピペットの孔の大きさを徐々に減少させてピペットを通して細胞を穏やかに摩砕することを包含する。好ましくは、ブタ胎児脳および切開されたブタ胎児脳の部分は、分離前には4℃よりもむしろ室温で保存する。

修飾されたもしくは未修飾（未改変）のブタ線条体細胞、およびとりわけブタ胚線条体細胞が、ハンチントン病のヒト患者に存在するような神経変性に起因する神経学的欠損の治療に使用され得る。いくつかの異なる動物で神経変性疾患のモデルが開発されており、それに本発明のブタ線条体細胞が移植され得、それらの神経再生能力が評価される。例えば、ハンチントン病のラット（アイザックソン (Isacson, O.) ら (1985) ニューロサイエンス (Neuroscience) 16:799-817）、ザル（カナザワ (K

anazawa, I.) ら (1986) Neurosci. Lett. 71:241-246) およびヒビ（ハントレイ (Hantraye, P.) ら (1992) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー

オブサイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)89:4187-4191; ハントレイ (Hantraye, P.)ら (1990) Exp. Neurol. 108:91-014; アイザックソン (Isacson, O.)ら (1989) Exp. Brain Res. 75(1):213-220) のモデルが記述されており、それらでの効果的な治療はヒトでの治療の有効性の前兆となる。

例証的实施例として、ハントレイ (Hantraye)らは、尾状核-被殻にイボテン酸の損傷を受けたヒビでハンチントン病のモデルを創製している。ハントレイ (Hantraye, P.)ら (1992) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)89:4187-4191。イボテン酸で損傷したヒビは、ヒトでの死後のハンチントン病研究で観察される尾状核-被殻の神経病理学に類似するそれ、および、ドーパミン作働性の薬理的活性化後の舞蹈病様運動のような多様な薬物誘発性ジスキネジーを呈する。治療戦略を評価するため、ブタ線条体細胞およびとりわけ外側神経節隆起から得られるブタ胚線条体細胞が、ヒビの尾状核-被殻の損傷された領域内に導入され得る。形態学および免疫組織化学的研究がその後、慣習的技術により実行され得、ブタ線条体移植片が形態学および機能的にの双方で周囲の組織内に統合されるかどうか決定される。行動試験もまた標準的技術を使用して実行され得、移植片の周囲の組織との機能的統合が確認される。例えば、エリス (Ellis, J.E.)ら (1992) Exp. Neurol. 115(3):376-387; ハントレイ (Hantraye, P.)ら (1992) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad.

Sci. USA)89:4187-4191を参照。本明細書中の実施例3は、行動異常の矯正に帰着した、サルの損傷された脳領域内への本発明の線条体細胞の移植を記述する。

癲癇の場合は、ラットおよびサルの双方のモデルが存在し、その効果的な治療はヒトでの治療の有効性の前兆となる。例えば、聴原性癲癇発作を表すラットは商業的に入手可能である。かように、これらのラットの癲癇の病巣がつきとめられれば、本発明の細胞、好ましくは本明細書に記述される線条体細胞、または、GABAを産生するよう遺伝子的に修飾されているグリア細胞もしくは筋肉細胞のような他の細胞タイプが、癲癇の病巣に移植され得る。癲癇発作の発生および

程度の減少がその後決定され得る。ラットおよびサルの変性癲癇のモデルはまた興奮によっても創製され得る。これらの動物での変性癲癇の病巣がその後つきとめられ得（例えば、変性癲癇の病巣は例えば海馬に存し得る）、そして本発明の細胞、好ましくは本明細書に記述される線条体細胞もしくはGABAの十分な量を産生する細胞が、その変性癲癇の病巣に移植され得る。そうした移植に起因する行動の修飾がその後決定され得る。

D. 本質的に病原体を含まないブタから得られるブタ神経細胞を使用する異種被験体の脳の神経変性による神経学的欠損の治療方法

異種被験体の脳の神経変性による神経学的欠損の治療のための本明細書で開示される別の方法は、当該被験体に感染もしくは疾患を伝達することが可能である生物体もしくは物質を本質的に含まないブタから得られる神経細胞を異種被験体の脳の神経変性領域へ導入することを包含する。受容被験体に感染もしくは疾患を伝達することが可能である生物体もしくは物質を本質的に含まないブタは、上に、見出し「本質的に病原

体を含まないブタから単離されたブタ神経細胞」および「本質的に病原体を含まないブタからのブタ神経細胞の単離方法」のもとに記述される。神経変性および神経変性領域は、上に、見出し「修飾（改質）されたブタ神経細胞を使用する異種被験体の脳の神経変性治療方法」のもとに記述される。受容被験体に感染もしくは疾患を伝達することが可能である生物体もしくは物質を本質的に含まないブタから得られる、好まれるブタ神経細胞は、本明細書に記述される線条体細胞、皮質細胞および中脳細胞を包含する。脳の神経変性領域で神経集団を再構築するためには、これらの細胞は、それらが標準的技術を使用して由来する脳の領域と異なる被験体の神経変性領域内へ付加的に導入され得る。例えば、レンフランツ(Renfranz, P.J.)ら (1991) セル(Cell)66(4):713-729を参照。

本質的に病原生物体を含まないブタから得られたブタ線条体細胞は、上に、見出し「ブタ線条体細胞を使用する異種被験体の脳の神経変性による神経学的欠損の治療方法」のもとに記述されるハンチントン病および変性癲癇のモデルのようなモデルでそれらの神経再生能力について評価され得る。同様に、本質的に病原生物

体を含まないブタから得られるブタ中脳細胞は、中脳の神経変性の多様な動物モデルでそれらの神経再生能力について評価され得る。例えば、パーキンソン病のいくつかの動物モデルが創製されており、そこでの効果的な治療はヒトでの治療の有効性の前兆となる。これらの動物モデルは、3種のラットモデル（6-ヒドロキシドーパミン、1-メチル-4-フェニル-1, 2, 3, 6-テトラヒドロピリジン（MPTP）での処理、もしくは黒質線条体経路の外科的横断切開により引き起こされる黒質のドーパミン作働性（作用性）細胞の損傷を有するラット）（例えばビョルクlund(Bjorklund, A.)

ら（1982）ネイチャー(Nature)298:652-654を参照）、1種のアカゲザルモデル（MPTPでの処理により引き起こされる黒質のドーパミン作働性細胞の損傷を有するサル）（例えば、スミス(Smith, R.D.)ら（1993）ニューロサイエンス(Neuroscience)52(1):7-16；ベイケイ(Bakay, R.A.)ら（1985）AppJ. Neurophysiol. 48:358-361；ザミール(Zamir, N.)ら（1984）Brain Res. 322:356-360を参照）、および1種のヒツジモデル（MPTPでの処理により引き起こされる黒質のドーパミン作働性細胞の損傷を有するヒツジ）（バシュキン(Baskin, D.S.)ら（1994）Life Sci. 54(7):471-479）を包含する。パーキンソン病のこれらのモデルのいずれかひとつでの治療の有効性はヒトでの治療の有効性の前兆となる。

治療戦略を評価するために、ブタ中脳細胞、およびとりわけ上に記述される本質的に病原体を含まないブタから得られるブタ胚中脳細胞が、これらの動物モデル内に導入され得る。形態学および免疫組織化学的研究がその後、慣習的技術により実行され得、当該ブタ中脳移植片が、形態学および機能的にの双方で、周囲の組織内に統合されるかどうか決定される。行動試験もまた実行され得、移植片の周囲の組織との機能的統合が確認される。例えば、普遍的な行動試験は回転対称性モデルである。フリード(Freed, W.J.)ら（1984）「トランスプランテーション オブ カテコールアミン-コンテイニング ティッシューズ トゥ リストア ザ ファンクショナル キャパシティ オブ ザ ダメージド ニグロストリアタル パスウェイ(Transplantation of catecholamin-containing tissues to restore the functional capacity of the damaged nigrostriatal

pathway)」、スラデク (Sladek, J.R.) (編) ニュ

ーラル トランスプランツ：ディベロップメント アンド ファンクション (Neural Transplants: Development and Function)」中 (プレナム プレス (Plenum Press)、ニューヨーク) 373-406。簡単には、動物例えば黒質線条体経路の一侧の6-ヒドロキシドーパミン損傷のあるラットは、アンフェタミンを注入された場合に損傷された側 (同側性) の方向での回転を表す。成功した移植の後には同側性の回転は抑制され、また、逆 (反対側性) に向けられた回転がしばしば観察される。ブランディン (Brundin, P.) ら (1987) *Progress in Brain Res.* 71:293-308。回転のデータはその後、同側性の回転から反対側性の回転を差し引くことにより算出される正味の同側性の回転として記録される。中脳移植片の統合の評価に使用され得る行動試験の他の例は、グリップ強度試験 (デュネ (Dunnett, S.B.) ら (1984) *Brain Res.* 215:147) および水迷路試験 (例えば、コピョフ (Kopyov, O.V.) ら *Transplantation Proc.* 24(2):547-548を参照) を包含する。

治療戦略を評価するために、ブタ皮質細胞、およびとりわけ上に記述される本質的に病原体を含まないブタから得られるブタ胚皮質細胞が、皮質機能不全の動物モデル内に導入され得る。皮質の損傷は、例えば、NMDA (ビール (Beal, M.F.) ら (1991) *J. Neuroscience* 11(1):147-158) を包含する様々な物質により実験動物中で誘発され得る。形態学および免疫組織化学的研究がその後、慣習的技術により実行され得、当該ブタ皮質移植片が、形態学および機能的にの双方で、周囲の組織内に統合されるかどうかが決定的である。行動試験もまた実行され得、移植片の周囲の組織との機能的統合が確認される。

E. 被験体の脳の神経変性領域内に導入されたブタ神経細胞の生存を増

## 大する方法

本発明のブタ細胞は、移植のためのそれらの調製のいずれの段階、例えば切開、トリプシン処理、分離および培養、ならびに／もしくは移植のための細胞懸濁液の産生の間、インビトロおよび／もしくはインビボすなわち受容被験体での当該細胞の生存、増殖 (生育) および分化を促進する多数の作用物質もしくは因子

とともにインキュベーションされ得、および／もしくはそれらで処理され得る。ひとつの態様において、そうした作用物質もしくは因子は、本発明の細胞が受容被験体の移植部位に移植された後にそこに添加され得る。いくつかの例では、これらの作用物質は、例えば、移植のために当該細胞を調製するのに使用される処置に起因する細胞への有害な影響を最小にし得るかもしくは打消し得る。例えば、ブタ細胞は、ドナーのブタから単離しそして移植のために調製される場合、スーパーオキシドラジカルアニオン、過酸化水素およびヒドロキシルフリーラジカルのような活性酸素種 (ROS) の産生につながる細胞の傷および／もしくは低酸素状態を経験しうる。コルトン (Colton, C.A.) ら (1995) *Exp. Neurol.* 132:54-61。ROS は、おそらく、イオンチャンネル、膜脂質、Na/K ATPアーゼおよび Na<sup>+</sup>/グルタミン酸交換移送のような移送メカニズムならびにグルタミン合成酵素のような細胞質酵素を包含する多様な膜および細胞内の成分に影響を与えることにより、神経機能に悪影響を及ぼすことが知られている。コルトン (Colton, C.A.) ら (1995) *Exp. Neurol.* 132:54-61。ROS への神経末端の急性の被曝は神経伝達機能不全をもたらす。コルトン (Colton, C.A.) ら (1991) *Free Rad. Res. Commun.* 14:385-393; コルトン (Colton, C.A.) ら (1989) *Free Rad. Biol. Med.* 7:3-8。ROS への神経

末端の長期の被曝は神経突起の収縮、そして徐々に神経死に帰着する。ハリウェル (Halliwell, B.) ら *フリーラジカルス イン バイオロジー アンド メディシン (Free Radicals in Biology and Medicine)*、第2版 (クラレンドンプレス (Clarendon Press)、オクスフォード、イギリス 1989)。加えて、ROS は膜脂質の過酸化を誘発し、結果として移植物中の神経細胞の生存を減少させることが知られている。

移植のための調製の間のこれらのタイプの酸化ストレスの悪影響を最小限にしおよび／もしくは打ち消すため、本発明の細胞は、調製の間のいずれの段階でも抗酸化剤とともにインキュベーションされ得、および／もしくはそれらで処理され得る。こうした抗酸化剤の例は、それぞれベーリンガー マンハイム (Boehringer Mannheim) (インジアナポリス、インジアナ州) およびシグマ ケミカル

カンパニー(Sigma Chemical Company) (セントルイス、ミズーリ州) から商業的に入手可能な酵素抗酸化剤スーパーオキシドジスムターゼ(SOD) およびグルタチオンペルキシダーゼ(コルトン(Colton, C.A.)ら(1995) Exp. Neurol. 132:54-61)、グルタチオン形成を促進する作用物質例えばこれもまたシグマ(Sigma)から商業的に入手可能なN-アセチルシステイン(NAC)、ならびにアップジョン(Upjohn)から入手可能なラザロイド例えばU-74389GおよびU-83836E(ナカオ(Nakao, N.)ら(1994) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 91:12408-12412; フロドル(Frodl, E.M.)ら(1994) ニューロレポート(NeuroReport)5:2393-2396)のような他の既知の抗酸化剤を包含する。SODのような抗酸化酵素は、ROSを捕獲しそして過酸化亜硝酸アニオンを形成するスーパーオキシ

ドの一酸化窒素との反応を防止する。過酸化亜硝酸アニオンは培養したニューロンに毒性であることが示されている。ナカオ(Nakao, N.)ら(1995) ネイチャー メディシン(Nature Medicine)1(3):226-231。これらの酵素は上に記述されるように本発明の細胞とともにインキュベーションされ得る。これらの酵素を本発明の細胞調製物中に導入する別の方法は、こうした酵素をコードする核酸を含有するように細胞を遺伝子的に修飾することである。この遺伝子的に修飾された細胞はその後、受容被験体中の移植された細胞の生存、増殖および分化を高める作用物質を産生し得る。例えば、本発明のブタ細胞は、酸素フリーラジカルの無毒化での中枢の酵素Cu/Znスーパーオキシドジスムターゼに対するヒト遺伝子でトランスフェクションされ得る(ナカオ(Nakao, N.)ら(1995) ネイチャー メディシン(Nature Medicine)1(3):226-231)。これらのトランスフェクションされた細胞はその後SODを発現し、そして、結果として組織の調製および移植の間に創製されるROSを効率的に無毒化し、それにより移植片の生存を増大させる。

ラザロイドはグルココルチコイド活性を欠く21-アミノステロイドであり、かつ、細胞膜内に局在しそして脂質過酸化を阻害するよう特異的にデザインされて

いる（それらの脂溶性部分をリン脂質二重層内に挿入することにより膜を安定化する（ナカオ(Nakao, N.)ら(1994)プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)91:12408-12412; フロドル(Frodol, E.M.)ら(1994)ニューロレポート(NeuroReport)5:2393-2396)）。ラザロイドはまたフリーラジカル、とりわけヒドロキシルラジカルを捕獲することも知られている。細胞培養系および細胞懸濁液に添加され得る抗

酸化剤の他の例は、TGF $\beta$ （プレーン(Prehn, J.H.M.)ら(1994)プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)91:12599-12603)、ビタミンE（ナカオ(Nakao, N.)ら(1995)ネイチャー メディシン(Nature Medicine)1(3):226-231)、ビタミンC、ベータカロチン、ならびに、ROSを捕獲し、ROSの産生を阻害し、および／もしくは脂質過酸化を阻害する他の化合物を包含する。

加えて、インビトロの細胞の酸化的環境は細胞の酸化的ストレスを阻害するように修飾され得る。例えば、移植のためのブタ細胞の調製の間、細胞の環境中の酸素分圧は、通常の酸素分圧すなわちおよそ150トールO<sub>2</sub>から減少した酸素分圧すなわち38トールO<sub>2</sub>（約5% O<sub>2</sub>）まで減少され得る。酸化的ストレスを減少する方法は、上に記述される抗酸化剤のひとつもしくはそれ以上での細胞の処理と組み合わせられ得る。例えば、38トール（例えば5% O<sub>2</sub>）の酸素分圧とNACでの処理との組み合わせはTH+ニューロンの生存を促進するのに有効である。コルトン(Colton, C.A.)ら(1995) Exp. Neurol. 132:54-61。

移植のための本発明の細胞の調製に伴う低酸素状態の間に、細胞外空間での興奮性アミノ酸の放出がN-メチル-D-アスパラギン酸(NMDA)レセプターを刺激し、一酸化窒素合成酵素(NOS)の活性を増大させる。これは順に一酸化窒素(NO)の増大した生合成に帰着する。一酸化窒素は過剰形成の状況下では毒性であり得る神経伝達物質である。ドーソン(Dawson, T.)ら(1995)ニューロサイエンティスト(The Neuro scientist)1(1):7-17。NOの毒性効果は、過酸化亜硝酸を形成するスーパーオキシドアニオンとの相互作用を通じて発生する。過酸化亜硝酸

はタンパク質をニトロシル化しおよび脂質過酸化を開始することが可能である、高度に反応性の分子である。過酸化亜硝酸はまた、ヒドロキシルフリーラジカルおよび二酸化窒素フリーラジカルを自発的に分解もする。これらのラジカルは多様な毒性効果を媒介する。ドーソン(Dawson, T.)ら(1995) ニューロサイエンティスト(The Neuroscientist)1(1):7-17。ガングリオシド、FK506およびシクロスポリンA(ドーソン(Dawson, T.)ら(1995) ニューロサイエンティスト(The Neuroscientist)1(1):7-17)のようなNO合成阻害剤がNOの産生を阻害するために細胞調製物に添加され得、それにより過酸化亜硝酸およびその誘導体の産生を減少させる。スーパーオキシドジスムターゼは、NOの過剰産生の悪影響およびそれが媒介する毒性効果を低減し得る、別の作用物質である。ドーソン(Dawson, T.)ら(1995) ニューロサイエンティスト(The Neuroscientist)1(1):7-17。

傷およびそれが関連する悪影響、例えば、移植のための本発明の細胞の調製により誘発される、膜の過酸化、フリーラジカル誘発性の細胞損傷(ゴンザレスーガルシア(Gonzalez-Garcia, M.)ら(1995) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)92:4304-4308; チョン(Zhong, L-T.)ら(1993) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)90:4533-4537)もまた移植された細胞のプログラムされた細胞死(アポトーシス)に帰着し得る。移植された細胞でのアポトーシスの発生を低減するため、本発明のブタ細胞は、bcl-2(タレイ(Talley, A.K.)ら(1995) Moll. Cell Biol. 15(5):2359-2366; メリー(Merry, D.E.)ら(1994) ディベ

ロップメント(Development)120:301-311; プレーン(Prehn, J.H.)ら(1994) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)91:12599-12603; チョン(Zhong, L-T.)ら(1993) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)90:4533-4537)、bcl-xL、bcl-x $\beta$ (ゴンザレスーガルシア(Gonzalez-Garcia, M.)ら(1995) プロシーディング

ス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)92:4304-4308)、および／もしくは c r m A (タレイ (Talley, A.K.)ら (1995) Mol. Cell Biol. 15(5):2359-2366) 遺伝子産物のような、抗アポトーシス遺伝子産物をコードする核酸でトランスフェクションされ得る。これらの遺伝子産物はプログラムされた神経細胞死を阻害することが示されている。加えて、本発明のトランスフェクションされたブタ細胞は、細胞により産生される抗アポトーシス遺伝子産物の神経保護効果を増すために、これらの遺伝子産物の発現もしくは機能をアップレギュレーションする作用物質、例えば、b c l - 2 の発現をアップレギュレーションする T G F  $\beta$  1 および T G F  $\beta$  3 (ゴンザレス-ガルシア (Gonzalez-Garcia, M.)ら (1995) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)92:4304-4308; プレーン (Prehn, J.H.)ら (1994) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)91:12599-12603) で処理され得る。神経増殖因子 (N G F) および血小板由来増殖因子 (P D G F) のような他の因子が抗アポトーシス活性を有することが見出されている (チョ

ン (Zhong, L-T.)ら (1993) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)90:4533-4537)。本発明の細胞は、従って、これらの因子をコードする核酸でもまたトランスフェクションされ得る。スーパーオキシドジスムターゼおよびカタラーゼ (ボンフォコ (Bonfoco, E.)ら (1995) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)92:7162-7166) のような酵素抗酸化剤ならびに N A C (タレイ (Talley, A.K.)ら (1995) Mol. Cell Biol. 15(5):2359-2366) のような他の抗酸化剤もまた、本発明の細胞が移植のための調製の間にプログラムされた細胞死を受けるのを防止するのに使用され得る。

受容被験体での本発明のブタ細胞の生存をさらに促進するため、当該細胞は、血管新生作用物質とともに移植され得るか、もしくは血管新生作用物質をコード

する核酸でトランスフェクションされ得る。移植に際し、この血管新生作用物質はブタ神経移植片内への血管の伸長を促進する。血管の内部へのこの伸長の結果として、移植片細胞は受容被験体内で増殖しかつ生存するのに十分な栄養を得る。多くの増殖因子が血管新生活性を表す。例えば、そのmRNAの代替のスプライシングによる4個の形態で存在する血管内皮増殖因子(VEGF)(ドレイク(Drake, C.J.)ら(1995) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)92:7657-7661; シャルマ(Sharma, H.S.)ら(1995) Biochim. Biophys. Acta 1260:235-238; ミラウアー(Millauer, B.)ら(1993) セル(Cell)72:835-846)は強力な内皮有糸分裂促進物質である。PDGF、酸性および塩基

性の線維芽細胞増殖因子(FGF)(ドレイク(Drake, C.J.)ら(1995) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)92:7657-7661)、上皮増殖因子(EGF)およびKGF(ブリストル(Brustle, O.)ら(1992) オンコジーン(Oncogene)7(6):1177-1183)もまた血管新生活性を所有し、かつ、本発明の方法において本発明の移植される細胞への血管の伸長を助長するのに使用され得る。

神経向性因子のような、神経発達、神経線維形成およびニューロンの維持に寄与する他の因子は、移植のための調製の間にインビトロで本発明の細胞に、および／もしくは本発明の細胞と共にの受容被験体への導入のために細胞懸濁液それ自身に、添加され得る。本発明の細胞はまた、本明細書に記述されるような神経向性因子を産生するように遺伝子的に修飾もされ得る。本発明の細胞に添加される神経向性因子は、移植されるべき細胞上のそのレセプターの存在に基づき選択され得る。例えば、中脳細胞は以下の神経向性因子についてのレセプターを所有する。すなわち、中脳細胞の生存、その形態学的分化、および中脳細胞への高親和性のドーパミン取り込みを促進するグリア細胞株由来神経向性因子(GDNF)(トマ(Tomac, A.)ら(1995) ネイチャー (Nature) 373:335-339; ベック(Beck, K.D.)ら(1995) ネイチャー (Nature) 373:339-341; プールソン(Poulson, K.T.)ら(1994) ニューロン(Neuron)13:1245-1252; シュトレムベルク(Stromberg

, I.)ら (1993) *Exp. Neurol.* 124:401-412) ; 脳由来神経向性因子 (BDNF) (トマ(Tomac, A.)ら (1995) *ネイチャー (Nature)* 373:335-339 ; ハイマン(Hyman, C.)ら (1994) *J. Neurosci.* 14(1):335-347) ; 中脳細胞の軸索切断術誘発性変性を

防止する繊維神経向性因子 (CNTF) (ハグ(Hag, T.)ら (1993) *プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)* 90:6315-6319) ; 中脳細胞の生存および分化を促進するミドカイン (キクチ(Kikuchi, S.)ら (1993) *Neurosci. Lett.* 160:9-12) ; 中脳細胞の生存および成熟を増大するEGF (キャスパー(Casper, D.)ら (1991) *J. Neurosci. Res.* 30:372-381 ; クヌゼル(Knusel, B.)ら (1990) *J. Neurosci.* 10:558-570) ; インスリン様増殖因子 I および II ならびにインスリン (クヌゼル(Knusel, B.)ら (1990) *J. Neurosci.* 10:558-570) ; 酸性FGF (エンゲレ(Engle, J.)ら (1991) *J. Neurosci.* 11:3070-3078) ; 神経突起をもつ細胞の数およびそれらの線維ネットワークの程度での大きな増大を誘発する塩基性FGF (フェラーリ(Ferrari, G.)ら (1989) *Devel. Biol.* 133:140-147) ; ニューロトロフィン-3 (NT-3) およびニューロトロフィン 4/5 (NT-4/5) (ハイマン(Hyman, C.)ら (1994) *J. Neurosci.* 14(1):335-347) ; ならびにトランスフォーミング増殖因子- $\beta 2$  (TGF $\beta 2$ ) およびトランスフォーミング増殖因子- $\beta 3$  (TGF $\beta 3$ ) (プールソン(Poulson, K.T.)ら (1994) *ニューロン(Neuron)* 13:1245-1252) 。

線条体細胞の生存を促進する神経向性因子は線条体細胞上のレセプターの存在に基づいて選択され得る。塩基性FGFについてのレセプター (フェラーリ(Ferrari, G.)ら (1989) *Devel. Biol.* 133:140-147) 、BDNFのレセプター (ハイマン(Hyman, C.)ら (1994) *J. Neurosci.* 14(1):335-347) 、NT-3 および NT-4/5 のレセプター (ハイマン(Hyman, C.)ら (1994) *J. Neurosci.* 14(1):335-347) が線条体細胞

上に見出され得る。かように、ひとつの態様において、本発明の線条体細胞はこ

これらの因子のひとつもしくはそれ以上をコードする核酸でトランスフェクションされ得る。別の態様においては、これらの因子のひとつもしくはそれ以上が移植に先立ち線条体細胞の調製物に添加され得る。これらの神経向性因子は、受容被験体での本発明の細胞、とりわけ本発明の線条体細胞の生存を高める。同様に、皮質細胞に特異性を表し、そして結果として受容被験体内への移植に際してそうした細胞の生存を促進するのに使用され得る神経向性因子は、例えば軸索切除された前脳のコリン作働性神経の委縮を防止する神経増殖因子（NGF）（リンゼイ（Lindsay, R.M.）ら（1994）TINS 17(5):182-190）；BDNFならびにNT-3およびNT-4/5（リンゼイ（Lindsay, R.M.）ら（1994）TINS 17(5):182-190）を包含する。

別の態様においては、本明細書に記述される神経向性因子が、それらの神経向性効果を増すために神経伝達物質のような他の化合物と一緒にもしくは組み合わせて使用され得る。例えば、酸性もしくは塩基性のいずれかのFGFとカテコールアミンの組み合わせは、同時にもしくは連続して適切な神経細胞と接触される場合に、チロシンヒドロキシラーゼの発現を誘発し得る。デュ（Du, X.）ら（1995）J. Neurosci. 15(7):5420-5427。加えて、本明細書に記述される神経向性因子の様々な組み合わせは相乗作用的に作用し得、そして従って本発明の移植された細胞の生存を促進するのに一緒に使用され得ることが企図される。

ある薬物もまた神経向性活性を所有する。そうした薬物の例は、例えばNOSのリン酸化されるレベルを増すことによりN-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）レセプターで作用するグルタミン酸により導

き出される神経毒性を阻害するFK506およびシクロスポリンA（リオン（Lyons, W.E.）ら（1994）プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)91:3191-3195）を包含する。リン酸化されたNOSがその触媒活性を阻害すると、これらの薬物はNO形成を効果的に抑制し、そしてこれらの細胞に対するNMDAの神経毒性効果を防止する。神経向性活性を所有しかつ本発明で使用され得る他の薬物は、FK506および／もしくはシクロスポリンAと同じ結合タンパク質に結合しそして従っ

て類似の神経保護効果を媒介するそうした小さな分子である。リヨン(Lyons, W. E.)ら (1994) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)91:3191-3195。

上に記述される作用物質および因子のひとつもしくはそれ以上の組み合わせが、本発明の細胞が受容被験体内に移植される前もしくは後に、当該細胞の生存を促進するために使用され得ることが本明細書でとりわけ企図される。例えば、本発明の細胞は、インビトロおよび／もしくはインビボでの当該細胞の生存を促進させるために本明細書に記述される作用物質もしくは因子のひとつもしくはそれ以上と接触され得る。別の態様においては、本発明の細胞は、本明細書に記述される作用物質もしくは因子のひとつもしくはそれ以上の核酸でトランスフェクションされ得、かつ、本明細書に記述される作用物質もしくは因子のひとつもしくはそれ以上ともまた接触され得る。さらに、本明細書に記述される神経向性因子の多くは特定の細胞タイプに特異的であるにもかかわらず、これらの因子のそうした細胞タイプとの関連(association)は、その因子

の異なる細胞タイプとの使用を排除しない。本発明の細胞の本明細書に記述される作用物質もしくは因子での処理は、同時にもしくは連続的に存在し得る。

本発明は、決してさらに制限されるように解釈されるべきでない以下の実施例によりさらに具体的に説明される。この明細書全体で引用される全ての引用される参考文献の内容(論文の参考文献、発行された特許、公開された特許明細書および同時出願中(co-pending)の特許明細書を包含する)はこの結果引用により明白に組み込まれる。

#### 実施例

実施例1：損傷されたラット脳へのブタ線条体細胞の移植および移植された細胞の組織学的検査

#### 実験デザイン

一連の実験で、75匹の成体の雄性シュプラグドレー(Sprague-Dawley)ラット(300~350g)が新線条体の興奮神経毒性損傷を、その後7日後にブタ胎児脳の線条体原基からの細胞の線条体内移植を受けた。移植されたラットはシクロス

ポリリンAで免疫抑制し、そしてそれらの移植片を移植後1ないし4ヶ月成熟させた。このラットはその後組織学的分析のために殺した。

#### ブタ胎児脳切開処置

授精後22ないし50日に、妊娠ヨークシャーブタ（115日の正常妊娠期間をもつ）を、タフツ大学獣医学部（グラフトン、マサチューセッツ州）で標準的な獣医学的処置に従い安楽死させた。子宮角を除去し、そして無菌実験施設（ダイアクリン インク (Diacrin, Inc.)、チャールズタウン、マサチューセッツ州）への移送のため氷上で保存した。無菌実験

施設で胎児をそれらの子宮嚢より取り出しそして滅菌したリン酸緩衝液処理生理的食塩水（PBS）に移した。頭から臀部までの長さ（CRL）を測定して匹敵する妊娠齢を確認した（第6A図）。層流フード下で胎児を断頭し、そして正中矢状切開により全脳を取り除いた。胎児脳の切開は切開顕微鏡下にPBS中で実行して基底終脳中の神経節隆起を露出させた（第6B図）。妊娠齢30日と40日の間のブタ胎児（E 30-40）は、終脳の基底中で外側神経節隆起（LGE）と内側神経節隆起（MGE）の間の明瞭な区分を表した。胎児脳の発達のこの段階はE 15ラットで見られるそれに形態学的に類似する。これはMGEおよび下にある皮質の双方を排除するLGEの選択的切除を可能にした（パクザバン (Pakzaban) ら（1993）Exp. Brain Res. 97(1):13-22の処置に従う）。第6B図は胎児脳中の外側神経節隆起の配置を図式的に図示する。E 35ブタ胎児脳中のLGEおよびMGEの配置および外観が第6C図および第6D図の顕微鏡写真に示される。E 30より若い胎児を検査したが、しかし切開のために神経節隆起を区別するには終脳の発達において未熟すぎることを見出し、一方、E 40より成長した胎児では、LGEとMGEの間の形態学的区別は識別できなかった。

切開後、切除した各LGE断片を、カルシウム、マグネシウム、重炭酸塩およびフェノールレッドを含まないハンク (Hank) の平衡塩溶液（HBSS；シグマケミカル カンパニー (Sigma Chemical Co.)、セントルイス、ミズーリ州）を含有する収集皿に移し、そして細胞が分離されることになるまで室温で保存した。重炭酸塩の存在は分離後の生存可能な細胞のパーセントを低減することが見出さ

れている。一腹の全胎児脳の双方の半球由来の組織断片を合わせた。この組織を、H B S S（シグ

マ(Sigma)) 中0.5%トリプシン－E D T Aおよびデオキシリボヌクレアーゼ中で37℃で15分間インキュベーションし、その後H B S Sで3度洗浄し、それから、乳状の懸濁液が得られるまで、徐々により小さい直径の火で磨いた(fire-polished)パストールピペットの先端を通して穏やかに磨碎した。徐々により小さい直径のパストールピペットの使用は、分離の間に細胞上に置かれるずり応力を低減する。分離のためのピペットの孔での漸進的変化の一例は以下のようなものである。すなわち、組織片を、まず、火で磨かれているがしかし通常の大きさの開口を有するパストールピペットで分離する。胎児脳組織の小片を、分離媒質の腫膨に変化がなくなる（すなわち、組織の小片から付加的な細胞が放出されない）まで、気泡の導入を避けて上下に慎重にピペッティングする。この時点で、より小さな開口の火で磨いた新たなパストールピペットをより大きな開口のピペットと取り替える。一般に、全部で4種の徐々により小さいピペット先端の開口のパストールピペットを細胞を分離するために使用する。先端の開口の小さすぎるピペットの使用を避けることが重要である。かように、より小さい先端の開口のピペットへの進行は、さらなる分離が要求されるがしかし現在の先端の大きさを使用しては起こらなくなるまで試みられるべきではない。分離の間の組織の小さな凝集塊の除去もまた、細胞上に置かれるずり応力を最小にする。加えて、100単位/mlのヒト組み換えデオキシリボヌクレアーゼⅠが、細胞の望まれない凝集を防止するのに分離の間に包含される。細胞濃度および生存能力は、血球計数器および蛍光顕微鏡でのUV外側照明法(UV epi-illumination)下でのアクリジンオレンジ／臭化エチジウム染色を使用して測定した（ブランディン(Brundin)ら (1985) Brain Res. 331:251-259)。

#### 損傷、移植および灌流の処置

ラットをペントバルビタール（65mg/kg、腹腔内）で麻酔しそしてコフ(Kopf)の定位枠に設置した。小さな切開によりバー孔を頭蓋に創製し、そしてキノリン

酸の  $1 \mu\text{l}$  注入 ( $120\text{nM}$ ) を、 $5 \mu\text{l}$  のハミルトンシリンジを使用し、新線条体内に（前頂に関しての定位座標：前方 =  $\pm 0.1$ 、外側 =  $\pm 2.5$ 、腹側 =  $-4.5$ 、切歯バー =  $-2.5$ ）一側に ( $n = 59$ ) もしくは両側に ( $n = 16$ ) 送達した。7 日後、損傷した各ラットを同じプロトコールに従い再麻酔し、そして同じ定位座標にブタ胎児細胞懸濁液移植片を与えた。10,000個と200,000個の間の生存可能な細胞（実験に依存する、結果を参照）を含有する懸濁液  $5 \mu\text{l}$  を注入した。細胞懸濁液は、22S ゲージ針（内径 =  $0.41\text{mm}$ ）を備えつけた  $5 \mu\text{l}$  のハミルトンシリンジで10分間にわたり  $1 \mu\text{l}$  の増量で注入し、追加の2分間をおき針をゆっくりと取り除く前に最後の注入圧の平衡を可能にした。

移植の日に開始し、実験の間、ラットをシクロスポリンA（ $10 \sim 15\text{mg/kg}$ 、毎日皮下注）で免疫して移植片の拒絶を防止した（ブランディン(Brundin)ら（1985）Brain Res. 331:251-259）。移植後の生存時間は5週間から16週間まで変動した。強いペントバルビタール麻酔（ $130\text{mg/kg}$ 、腹腔内）下に、ラットを100mlのヘパリンー生理的食塩水（ $0.9\%$  生理的食塩水中 $0.1\%$  ヘパリン）で、その後200mlの $0.1\text{M}$  リン酸緩衝液処理生理的食塩水  $\text{pH} 7.4$  (PBS) 中  $4\%$  パラホルムアルデヒドで、経噴門的(transcardially)に灌流した。

組織学的調製、染色および免疫組織化学的処置

ラット宿主脳をPBS中 $4\%$  パラホルムアルデヒドで6～8時間、後固定し、そしてその後、 $40 \mu\text{m}$  の凍結したミクロトーム切片を切断する

前にPBS中 $30\%$  ショ糖に1～3日間浸した。切片を6～8層(series)に分割しそしてPBS中 $4^\circ\text{C}$  で保存した。個々の層は、ニッスル染色（酢酸クレシルバイオレット）、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 組織学的染色、およびABC免疫組織化学（ベクター ラブス (Vestor Labs)、バーリンゲイム、カリフォルニア州）のいずれかのために処理した。この研究で使用された免疫組織化学的マーカーは、ドーパミンおよび環状AMP調節性リントンパク質、 $32\text{kD}$  (DARPP-32; ポール・グリーンガード (Paul Greengard) 博士、ロックフェラー大学、により恵与される) ; グリア線維酸性タンパク質 (GFAP; ベーリンガーマンハイム バイオケミカ (Boehringer Mannheim Bichemica)、インジアナポリ

ス、インジアナ州)；微小管関連タンパク質 1 b (MAP 1 B；トーマス・シーア(Thomas Shea)、マクリーン(McLean)病院、ベルモント、マサチューセッツ州、より恵与される)；分化抗原 44 のブタのクラスター (CD 44) およびウシ神経フィラメント、70kD (NF 70；バイオデザイン インク(Biodesign, Inc.)、ケンネブUNKポート、メリーランド州)、に対する抗体を包含する。

CD 44 および NF 70 に対する種特異的細胞マーカーの特徴づけ

おそらくブタ脳抗原に結合すると思われる 2 個の候補の抗体すなわち CD 44 および NF 70 に対する抗体を種特異性について試験した。ブタ成体の前脳では、CD 44 との免疫反応性 (CD 44-IR) は脳梁および内包の線維束を包含する全ての主要な白質路で見出されるが、しかし皮質の灰白質もしくは線条体で見出されない。白質構造内では、CD 44-IR はミエリン化された軸索の束に沿って伸長するフィラメントの突起を標識する。正常な成体ラット脳への、および興奮神経毒性の線条体の損

傷のみをもつラットでの非特異的結合のコントロール試験は、抗ブタ CD 44 抗体が対応する実験条件下でラット抗原と交差反応しないことを示す。

ブタ成体の前脳では、ウシ NF 70 との免疫反応性 (NF 70-IR) が白質および灰白質の構造の双方で見出される。NF 70-IR の軸索はミエリン化された線維路内で束を形成し、そして灰白質構造内で少しではあるものの密に染色されるが、しかしながら、NF 70-IR の神経体はほとんど観察されない。正常な成体ラット脳および興奮神経毒性の線条体の損傷のみをもつ成体ラットへの非特異的結合のコントロール試験は、抗ウシ NF 70 抗体が対応する実験条件下でラット抗原と交差反応しないことを示す。

移植片の体積に対する最初の細胞投与の影響

成体のブタおよびラットの脳、ならびにそれぞれ内の線条体の大きさの差異を考えると、ラット線条体に適切な大きさの同種移植片を産生することが示される胎児ラット細胞の数は同じ大きさのブタ異種移植片を産生するとあてにできないとみられる。従って、移植片の過剰増殖のいかなる都合の悪い影響も避け、そしてラットの同種移植片の研究に匹敵しうる結果を提供するためには、移植される

ドナー細胞の投与量と得られる移植片の大きさとの間の関係の予備的研究を実行することが必要であった。

宿主ラットにブタLGE細胞懸濁液の異なる用量を両側に移植した。8匹のラットは右線条体内に移植された100,000個の生存可能な細胞および左線条体内に移植された50,000個の生存可能な細胞を受け入れ、また、8匹のラットは右線条体内に移植された200,000個の生存可能な細胞

および左線条体内に移植された10,000個の生存可能な細胞を受け入れた。得られた移植片の体積を増殖8週後に測定した(第7A~7C図)。各細胞投与量の合わせたサンプルの体積の比較は増大する用量反応関係を示す。200,000個の細胞移植片は5.5mm<sup>3</sup>の平均体積を有し、また、ラット線条体の損傷された部分の大きな画分を満たしたがしかし肥大性ではなかった(第7A図、左)。他の全ての用量は線条体の損傷された領域より小さい移植片を産生する。これらの移植片は殺した時点では未だ未熟であったにもかかわらず、それらの大きさは比較しうるラット同種移植片の範囲内に良好にあると判断された。従って、その後の全ての実験では100,000個および200,000個の細胞の範囲内の細胞用量を使用した。

#### 異なる移植片齢での異種移植片の形態学の展開(development)

移植後の発生の4ないし5週後(おおよそ正常ブタ脳内の細胞の生存期間の中間点に対応する)、ブタ異種移植片は細胞構造で比較的同質である。それらは主として針の軌跡を取り巻く円柱を形成する小さくかつきつく詰め込まれた体からなり、そしてその移植片の小さな部分のみがAChE活性について染色される。発生の8週後、ブタ異種移植片は損傷された線条体内に伸長しておりかつ細胞構造的異種性を表す。ニッスル染色は、その移植片が大きな細胞の領域に対し明瞭な小細胞の領域に分離されることを示し、また、これらは、近接するAChE染色された切片に見られるようにそれぞれAChEの豊富な領域およびAChEの乏しい領域に対応する(より詳細に以下に記述される)。この段階で、AChEの豊富な領域は移植片の総体積の25%から40%までであると測定された。発生の16週後、移植片のより大きな画分は、これもまたAChEが豊富である大きな神経体クラスターから成り、そしてこの移植片

は線条体の損傷された部分に伸長しており、明確な小区域に組織化される、異なる形態学および密度の細胞を包含する。

ブタ異種移植片の細胞構造的および免疫組織化学的な特徴づけ

ブタCD44に対する抗体がこの移植片のブタ由来のグリア組織に選択的に結合するという証拠は、移植片全体に近接する切片でのCD44およびGFAPに対する抗体で染色される構造の比較により、ならびに、CD44-IRの細胞の形態学的外観により提供される。8週齢のブタ異種移植片の付近では、GFAPに対する抗体は、移植片を取り巻くラット宿主の星状細胞および移植片内のブタグリア細胞の双方を染色する。結果として、移植片-宿主の境界は不明瞭であるが、とはいえ移植片内の比較的より高いGFAPとの免疫反応性(GFAP-IR)の細胞密度が、それをさらに周囲の損傷された線条体内へ漸進的に減少するGFAP-IRの細胞の密度と区別する。GFAP-IRは正常な成体ラット線条体では極微量である(そして移植された動物の脳の反対側の正常な線条体には本質的に存在しない)にもかかわらず、GFAPの発現は損傷に応答してアップレギュレーションされることが知られており(ビグナミ(Bignami, A.)らアドヴァンシーズ イン セルラー ニューロバイオロジー(Advances in Cellular Neurobiology)中、フェデロフ(Federoff, S.)とヘルツ(Hertz, L.)編(アカデミック プレス(Academic Press)、ニューヨーク 1980)、1:285-310; ビョルクlund(Bjorklund, A.)ら(1986) Brain Res. 371:267-277; コフエイ(Coffey, P.J.)ら(1990) ニューロサイエンス(Neuroscience)35:121-132; アイザックソン(Isacson, O.)ら(1987) ニューロサイエンス(Neuroscience)20:1043-1056)、また、おそらく移植片を取り巻くこれらの細胞のかなりの数の

原因である。対照的に、CD44-IRは発生のこの段階では主として移植片に限られる。ブタCD44-IRの主な領域は、ニッスルおよびAChEで染色される近接する切片で同定されるように、移植片の体積に密接に対応し、また、最も密集したGFAP-IRの領域に対応する。CD44で染色されるフィラメントが移植片の境界線を越えて伸長するのが見られ得るが、しかしほとんどの部分については、宿主線条体の周辺の損傷されたおよび正常な領域はCD44-IRの構造を

ほとんど含有しない。移植片の集合体から分離して見出され得る少数の単離されたCD44-I Rの細胞は、GFAPに対し免疫反応性である細胞と形態学的に極めて類似し、星状細胞様の外観を表す。CD44-I Rはまた、近接する白質路中の線条体の外側でも、主として不規則な形をとったフィラメントの形態で見られる。

これらの移植片の最も著しい細胞構造的特徴のひとつは、ニッスル染色される切片で見られる大きなニューロンのクラスターへの配置である。これらのクラスターは直径およそ250 $\mu$ mから600 $\mu$ mまでにわたり、かつ、より小さくそしてより密に詰め込まれた細胞を含有する移植片の周囲の領域からそれらを分離する、比較的細胞を含まない環にしばしば取り巻かれる。ニッスル染色される小さな核の存在により指摘されるように、これらの神経クラスターを伴うグリア細胞が疑いなしに存在するにもかかわらず、それらはこの研究で使用された2種のグリアマーカー、GFAPおよびCD44のいずれかで最小限度に染色される。近接する切片でのAChEの組織化学的染色もまたこの細胞クラスター形成とのかなり正確な一致を表す。大きな神経体のクラスターはAChEに関して最も濃く染色される領域に配置される。濃いAChE染色のこれらの領域と、

神経クラスターを囲む細胞を含まない環に一致するAChEの乏しい境界物との間の、はっきりした境界がしばしば存在する。対照的に、反対の染色パターンがGFAPもしくはCD44のいずれかで染色される近接する切片で表される。AChEが豊富であるニューロンの同じクラスターは、GFAPおよびCD44双方について密に染色される周辺領域に比較して、GFAP-I RもしくはCD44-I Rのいずれかについて本質的に陰性である。AChEが豊富なクラスターをCD44の豊富な周囲の移植片と区別する境界は極めて明確であり得る。これらの2種のマーカーは、移植片を、ニューロンが豊富な組織もしくはグリアが豊富な組織のいずれかである2種の補足的な組織タイプに分割する。

これらのクラスター内の大きなニューロンはまたDARPP-32に免疫反応性(DARPP-32 I R)でもあるが、しかしながら、初期の段階(すなわち8週)では、このクラスターを取り巻く領域内に線維のDARPP-32染色もまた存

在する。より後期の段階（すなわち16週）では、AChE染色およびDARPP-32IRの双方とも、より強かつより良好に共局限されるようになる。加えて、神経クラスター、周囲の移植片および損傷された宿主線条体の染色での差異はより大きくなる。移植後16週までに、神経クラスター内の細胞および好中球の双方が強くAChE陽性かつDARPP-32-IRとなる。

#### ブタ異種移植片中の軸索の発生

ブタ神経フィラメントのエピトープに結合するがラットのエピトープとは結合しない抗体の利用性が移植片軸索の発生および伸長を直接追跡するとを可能にする。ラット中のブタ軸索のNF70との免疫反応性は高度に特異的であり、かつ、個々の軸索でさえも切片の平面内のかなり

の距離が追跡されることを可能にする。NF70-IRの線維は5週齢の移植片内ではほとんど見出されないが、しかし8週までにはNF70-IRの線維の密な叢が移植片の体積の大部分を満たす。移植片内の軸索の密な分布と対照的に、それらは近接する損傷された宿主線条体の移植片のちょうど外側にかなりより低い密度で存在する。これは、ブタのCD44-IRの細胞と宿主線条体との間のはっきりした境界と共存する移植片の境界の印象を与える。この境界は灰白質もしくは白質の宿主組織のいずれかと優先的に相関しない。

NF70との免疫反応性のパターンは、別の軽い神経フィラメント関連タンパク質すなわち微小管関連タンパク質IB（MAP1B）のそれと似ている。このタンパク質は初期の神経発生の間は高レベルで発現されるが、しかし軸索の発生のより後期の段階ではダウンレギュレーションされる（フィッシャー（Fischer, I.）とロマノ・クラルケ（Romano-Clarke, G.）（1990）*Mol. Cell Neurosci.* 2:39-51；フリークナー（Fliegner, K.H.）とリーム（Liem, R.K.H.）（1991）*Int. Rev. Cytol.* 131:109-167；ウロラ（Ułola, L.）ら（1993）*J. Neurochem.* 61:961-972）。MAP1B-IRの線維は、正常な成体ラット脳で、もしくは移植片から離れた移植された脳の領域では観察されなかった。NF70抗体およびMAP1B抗体の双方が、8週齢の移植片の体積内の密に部分的に重なる軸索の標識、および、周囲の宿主の好中球および近接する白質内に伸長するいくつかの線維を立証する

。これらの2種の抗体の高度に相関する染色がNF70の軸索特異性をさらに確認する。加えて、MAP1B-IRの線維の比較密度は、この段階でのブタ移植片の比較未熟度のひとつの指標である。

同じ移植片の、近接するニッスル染色切片、AChE染色切片およびNF70で免疫染色切片の比較は、軸索が、AChEについて染色されない密に詰め込まれた小さな細胞で満たされる移植片領域内に優先的に伸長することを示す。この相補性は、主としてグリア細胞領域内に散在する無数の神経細胞クラスターを含有する8週齢の移植片で明らかである。2個の8週齢の移植片で、神経細胞クラスターの付近のAChE染色およびNF70との免疫反応性のパターンが観察される。神経体クラスターの周囲に濃くAChE染色される環内へのNF70-IRの線維の若干の侵入が存在しうるが、しかし、クラスターの中心へはない。神経体の付近でのNF70-IRの線維の欠如は、その神経体に隣接しない軸索のより遠位の部分に局限されたNF70の発現を反映し、また、増殖する線条体移植片の軸索が比較的成熟した線条体様のニューロンのクラスターを含有する移植片領域に再び入らない傾向があることも指摘する。

移植片の集合体内のNF70-IRの線維の広汎な増殖と比較すれば、移植片を越える宿主脳への線維の伸長はまばらである。ドナーと宿主細胞の間の中間面を越えると軸索密度の著明な低減が存在する。これはまた周囲の損傷された線条体中のCD44-IRの細胞の低減とも一致する。しかしながら、若干の軸索は、近接する線条体および淡蒼球領域をめぐり、移植片の境界から500 $\mu$ mまでの距離に伸長するのが見られ得る。移植片から突出しそして近接する灰白質構造に突入する軸索の最多数は、内側に淡蒼球へ、および腹側に腹側淡蒼球へ、とりわけ前方交連の付近で伸長する。

近接する宿主線条体への軸索のまばらな伸長、および近接する淡蒼球領域への短い突出と対照的に、隣接する移植片の境界を越えて伸長する

移植片軸索のかかなりの割合は移植片に近接する線条体に浸透する内包線維束、脳梁および前方交連を包含する白質路で見出される。ミエリン化された線維路内へ

成長するドナーの軸索はそれらの路内の宿主線維の軌跡に平行に向けられる傾向があり、また、灰白質構造を通して伸長するそれらより移植片からさらに遠くへ伸長する傾向がある。

ブタのCD44-IRの構造の大多数は形態はフィラメント状であるが、とはいえ星状細胞様の外観をもつ構造のかなりの数もまた観察され得る。移植片を取り巻く宿主線条体の領域にブタのCD44-IRの細胞もしくは細胞突起がほとんど存在しないにもかかわらず、ブタのCD44-IRの線維が比較的多数で移植された線条体を取り巻く脳梁に存在する。脳梁内のCD44-IRの構造の密度は移植片からの距離とともに減少するが、しかし若干は反対側の脳梁の中央で観察され得る。宿主の白質路内のCD44-IRの線維の形態学および方向は、成体ブタ脳の白質路内で観察されるものと類似する。

CD44およびNF70について処理された脳梁全体の近接する切片の比較は、ドナー由来のグリアおよび神経線維を含有する領域間の緊密な一致が存在することを指摘する。先駆するグリアおよび軸索線維は、移植片からこれらの同じ宿主脳構造へ対応する密度で芽生える。双方とも周囲の宿主灰白質では比較的まばらであり、かつ近くの白質路でより密集して現れる。

異種移植のドナー種の移植片のグリアおよび軸索のタンパク質に対する種特異的な抗体の使用は、多数の他の不明瞭な細胞の相互関連およびドナーと宿主の細胞相互作用が明視化されかつ研究されるのを可能にする。8ないし16週後、ブタ線条体移植片は、細胞構造および染色の2種

の一般的パターン、すなわちa) AChEが豊富でかつ対比されるDARPP-32IRのニューロンのクラスターを含有する領域、b) AChEが乏しくかつグリアマーカーのGFAPおよびCD44について強く染色される密に詰め込まれた小さな細胞を含有する領域、のうちひとつを表す領域により特徴づけられる局所的な異種性を発生している。NF70-IRの軸索は移植片のAChEが乏しくグリアが豊富な部分を密に満たすことが見出される。移植片の境界線を越えると、CD44-IRおよびNF70-IRの構造の密度のかなりの低下が存在するが、しかしながら、それらは双方とも近接する淡蒼球領域、ならびに脳梁、前方交連お

および内包線維束内へ伸長することが見出される。これらの関係は第8図に概要図により要約される。

#### ブタ異種移植片のラット同種移植片との比較

ラット同種移植片が発生すると、AChEの組織化学的染色の強度の漸進的増大、および、移植片内のAChEの乏しい区域に比較してAChEの豊富な比率の増大の双方が存在する（ラバンデイラーガルシア(Labandeira-Garcia, J.L.)ら(1990) ニューロサイエンス(Neuroscience)42:407-426)。この傾向はまたブタ異種移植片でも観察される。5週齢であるブタ異種移植片ではAChE活性の表示は実に少ないが、しかし8週までには移植片内にAChEの豊富な多数の領域が存在する。とはいえ移植片体積の大きな画分はAChEが乏しいままである。16週（この研究で最長の生存期間）までには移植片のAChEの豊富な比率が優勢となり、また、若干の領域は、AChEについて成体の線条体組織が染まると同じくらい濃く染色される。DARPP-32-IRもまた、8週齢での移植片での比較的薄く染色される体および広汎性の薄く染色さ

れる好中球から、16週齢での移植片での濃く染色される神経体および局限された密に染色される好中球まで、漸進的に発展する。

ブタ線条体異種移植片でのAChE染色およびDARPP-32-IRの双方の増大の時間経過は、ラット同種移植片に比較してかなり延長される。2つの種の妊娠期間の比（21日対115日）が発達の時間経過の差異のおおまかな近似として使用される場合、その場合は2つの種の発達速度に5ないし6倍の差異が存在するはずである。しかしながらこれはおそらく過大評価であろう。なぜならラットはブタよりも出生時により未熟であると思われるからである（ディッカーソン(Dickerson, J.W.T.)とドビング(Dobbing, J.) (1967) Proc. Roy. Soc. B. 166:384-395; ザッハー(Sacher, G.A.)とシュタフェルト(Staffeltdt, E.F.) (1974) Amer. Natur. 108:593-616; スノウ(Snow, M.H.L.)とタム(Tam, P.P.L.) (1980) ネイチャー(Nature)286:107)。あるいは、これら2つの種の胎児脳が対応する神経節隆起の形態学を表す齢（15日対35日）は、ラットよりブタで2ないし3倍大きいのみである。これらの種での対応する発達齢を同定する精密な生化学的マ

ーカーが欠如しているにもかかわらず、胎児脳の形態学、妊娠の長さおよび移植片の発生の特徴に基づき、ブタ移植片の発達は3ないし4の係数で延長されると推定され得る。これは多数の他の胎児の特性の比較発生形態学由来の推定値と矛盾しない（ウルレイ (Ulrey, D.E.)ら (1960) *J. Animal Sci.* 24:711-717）。  
かように、移植後5、8および16週でのブタ異種移植片は、それぞれ移植後<1、1～2、および3～4週でのラット同種移植片に匹敵するはずである。これはこの研究で分析されたもっとも成長した移植片でさえ相対的に未熟であることを示唆する。

この研究でのブタ線条体異種移植片でのAChE染色のモザイク様の外観は、このドナー種での脳発生の発生のタイミングに関連して、および、線条体移植片の他の研究に比較してのここでのドナー細胞を提供する胎児脳構造の差異に関して、の双方で考慮されるべきである。

移植片の成熟段階は重要である。というのは、AChEの乏しくかつDARPP-32陰性の神経組織が線条体（フォスター (Foster, G.A.)ら (1987) *J. Neurosci.* 7:1994-2018）および比較的未熟な移植片（ラバンデイラーガルシア (Labandeira-Garcia, J.L.)ら (1990) *ニューロサイエンス (Neuroscience)* 42:407-426）の発達での初期の特徴的であるからである。これらのブタ異種移植片中へのAChE陰性移植片領域の包含は、かようにそれらの比較未熟性を指摘しうる。しかしながら、AChE陰性移植片組織の存在はまた、非線条体の発達の結果にゆだねられる細胞の包含にも起因する。ラットからラットへの同種移植の典型を使用して、発達するラット中脳の外側神経節隆起（LGE）が胎児線条体移植片に線条体様のAChEの豊富な領域を後に形成する神経原種をもつがしかし内側神経節隆起（MGE）はもたないことが以前に立証されている（パクザバン (Pakzaban, P.)ら (1993) *Exp. Brain Res.* 97:13-22）。この研究で使用されたブタ細胞はブタ胎児のLGEからのみ由来したため、得られる移植片中のAChEの乏しい領域の相対的豊富さが2つの種でのこの胎児脳構造の非相同性についての証拠として解釈され得るであろう。しかしながら、これらのブタ異種移植片中のAChEの乏しい領域はまた比較的ニューロンが乏しくかつグリアが豊富でもある。

かように、これらのLGE移植片でのAChE染色のモザイク様の分布は、外側および内側の神経節隆起の双方からの細胞を組み合わせる

ことに由来する同種移植片で以前に観察されたように（ディフィグリア(DiFigli a, M.)ら (1988) J. Neurosci. 8:1112-1130；グレイビール(Graybiel, A.M.)ら (1989) J. Neurosci. 9:3250-3271；アイザックソン(Isacson, O.)ら (1987) ニューロサイエンス(Neuroscience)22:481-497；ラバンデイラーガルシア(Labandeira-Garcia, J.L.)ら (1990) ニューロサイエンス(Neuroscience)42:407-426；ウィクトリン(Wictorin, K.)ら (1989) ニューロサイエンス(Neuroscience)30:313-330)、非線条体細胞集団に対する線条体集団の分離ではなく、グリア集団に対する神経集団の分離を反映する。これらの移植片のAChEの乏しい領域はグリアが豊富でかつニューロンが乏しいため、これらはLGE+MGE移植片のAChEの乏しい領域に類似してもおらず（アイザックソン(Isacson, O.)ら (1987) ニューロサイエンス(Neuroscience)22:481-497；パクザバン(Pakzaban, P.)ら (1993) Exp. Brain Res. 97:13-22；シリナトシングジ(Sirinathsinghji, D.J.) (1993) ニューロレポート(Neuroreport)4:659-662)、成体の線条体のAChEの乏しい領域の前駆体であるようでもない（グレイビール(Graybiel, A.M.)ら (1990) Trends Neurosci. 13:244-254；グレイビール(Graybiel, A.M.)ら (1989) J. Neurosci. 9:3250-3271)。

AChEが豊富で神経が豊富な移植片領域へであるがしかしグリアが豊富でAChE陰性の領域へではないDARPP-32-IRの体の局在（ウィクトリン(Wictorin)ら (1989) ニューロサイエンス(Neuroscience)30:313-330)は、LGE由来の神経前駆体がラットおよびブタ双方の胎児で線条体の発達の結果にゆだねられているというさらなる証拠を提供する（パクザバン(Pakzaban, P.)ら (1993) Exp. Brain Res. 97:1

3-22)。非線条体神経細胞もしくは未熟な線条体神経前駆体の存在がこれらの移植片のAChEの乏しい領域で排除され得ないにもかかわらず、これらの領域で表されるCD44およびGFAPに対する密な免疫反応性はそれらが主としてグリ

アとともに存在することを示唆する。ヒトからラットへの胎児LGE異種移植片もまた、初期の発生段階で、ドナー由来の神経および非神経集団の類似の分離を表す（未発表の観察）。これらの考察は、この移植片でのモザイク様の染色パターンが、主としてグリアおよびおそらくまた線条体神経原種細胞からも成る未熟な線条体成分の存在を反映することを示唆する。6ヶ月より成長した齢のブタ移植片との比較は、LGE異種移植片のこのACHEの乏しくグリアが豊富な成分がその後の移植片の発生で完全に排除されるかどうかを決定するのに必要である。

#### 移植片軸索とCD44-IRの移植片グリアとの間の関連

移植片ニューロンからの軸索は、主としてCD44-IRが存在するがしかし主として神経である移植片領域を欠く移植片領域内へ優先的に伸長する。CD44-IRの移植片グリアおよび移植片軸索の共局在はまた、宿主白質中の移植片の外側でも観察される。一緒にすると、これらの知見は、CD44-IRの移植片グリアが移植片からの線条体軸索の成長を促進する基質もしくは他の影響を提供することを示唆する。胎児のグリア細胞に対するこうした成長支持的な役割はインビトロ（アード(Ard, M.D.)ら (1988) Soc. Neurosci. Abstr. 14:748; ファロン(Fallon, J.R.) (1985) J. Cell Biol. 100:198-207; フォーセット(Fawcett, J. W.)ら (1989) Dev. Biol. 135:449-458; レモン(Lemmon, V.)ら (1992) J. Neurosci. 16:64-72; ノーブル(Noble, M.)ら (1984) J. Neurosci. 4

:1892-1903) およびインビボ（ブレイ(Bray, G.M.)ら (1987) J. Exp. Biol. 132:5-19; モントゴメリー(Montgomery, C.T.)とロビンソン(Robinson, J.A.) (1993) Exp. Neurol. 122:107-124; ニエト-サンペドロ(Nieto-Sampedro, M.)ら (1984) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)81:6250-6254; クロマー(Kromer, L.F.)ら (1981) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)82:6330-6334; シルヴァー(Silver, J.)とオガワ(Ogawa, M.Y.) (1983) サイエンス(Science)220:1067-1069) の双方で立証されている。

移植片軸索の大多数は移植片内に留まったままのようであり、宿主の境界に対して明確な移植片境界を産生する。移植片の外側に比較して移植片内での軸索の高い密度もまたヒト線条体異種移植片について報告されている（ウィクトリン(Wictorin)ら (1990) ネイチャー (Nature)347:556-558)。これは、部分的には、周囲の線条体の興奮神経毒性の損傷に応じて蓄積する活性化された小グリア細胞の軸索成長阻害効果の結果でありうる（ボヴォレンタ(Bovolenta, P.)ら (1993) ニューロレポート (Neuroreport)5:345-348；コフェイ(Coffey, P.J.)ら (1990) Neurosci. 35:121-132) が、しかし軸索の成長を可能にするかもしくは阻害する基質の識別的な存在もしくは非存在もまた反映しうる（ファロン(Fallon, J.R.) (1985) J. Cell. Biol. 100:198-207；ピニ(Pini, A.) (1993) サイエンス (Science)261:95-98)。

移植片内の、ニューロンが豊富でAChEが豊富なDARPP-32-IRの神経領域もまたNF70-IRの移植片軸索を含まない傾向がある。

こうしたほとんど軸索を含まない移植片の領域は、成熟した線条体の特性に相同である特性を表し、かつ多様な線条体の求心性システムからの求心性神経についての好まれる移植片の標的である（ラバンデイラーガルシア(Labandeira-Garcia, J.L.)ら (1991) Neurosci. 42:407-426；プリツェル(Pritzel, M.)ら (1986) Exp. Brain Res. 65:112-126；ラザフォード(Rutherford, A.)ら (1987) Neurosci. Lett. 83:275-281；ウィクトリン(Wictorin, K.)ら (1988) Prog. Brain Res. 78:55-60；ウィクトリン(Wictorin, K.)ら (1989) ニューロサイエンス (Neuroscience)30:313-330)。この研究でのこれらの移植片領域への移植片軸索の最小限の浸透は、従って、おそらく特異的な基質の差異によるとみられる。これらの領域が成熟な線条体と相同であると仮定すると、これらの移植片領域を通して移植片軸索を成長させないようにするいかなる因子もしくは親和性も、宿主線条体を通じ、軸索の低下した成長にもまた寄与しうる。主要な線条体の遠心性神経の軸索についての標的が線条体の外側に存するため、これらの線条体様の移植片ニューロンからの軸索が線条体様組織に最小限の親和性を示すことは驚くことではない。CD44-IRのグリアが線条体の軸索の成長を援助する基質を提供する

場合、軸索が、移植片の神経クラスターおよび宿主の線条体の双方を包含するこうしたグリアを欠く領域内へ成長する傾向はないとみられる。これらのデータからは、しかしながら、移植片軸索は単に移植片由来のCD44-IRのグリアにより大きな親和性を表すのみなのか、もしくはそれらが付加的な反発する影響にもまた応答するのかどうかは決定され得ない（ピニ(Pini, A.) (1993) サイエンス(Science)261:95-98)。

宿主脳内への軸索の成長に関するこれらの明らかな制約は、ラット同

種移植片に比較して、ヒトおよびブタの異種移植片からの軸索の伸長での差異の起源に対する手掛かりを提供しうる。ラット移植片（ラバンデイラーガルシア(Labandeira-Garcia, J.L.)ら (1989) ニューロサイエンス(Neuroscience)42:407-426) もしくはマウス移植片（ウィクトリン(Wictorin, K.)ら (1990) Prog. Brain Res. 82:391-399) と比較すると、ヒトおよびブタの移植片でのグリアおよび軸索の成長の発生的に延長された期間は、移植片細胞の突起が比較的非許容的な成体宿主組織を通る経路を配置するかもしれないと創造することが可能であろうという見込みを増大させうる。

宿主脳内への軸索の生長

淡蒼球への短距離の軸索の成長は標的特異的成長の証拠を提供する。移植片部位の近くでは、軸索が、典型的な局所の線条体の遠心性神経の標的である、近接する淡蒼球領域を浸透するのが見られ得る。より多くの線維が、その境界に近く、比較的腹側および内側に置かれた移植片から淡蒼球を浸透するのが見られる。8週齢の移植片においてさえ、軸索が移植片から隣接する淡蒼球まで約200 $\mu$ mほど伸長するのが観察され、また、個々の軸索の分枝は移植片から500 $\mu$ mまで見出され、腹側淡蒼球領域を浸透する。標的への移植片の近接は、軸索が発生のこの初期の段階までにそれらの標的に到達するであろうという可能性に影響を与える重要な因子であるようである。

しかしながら、軸索の成長の完全な範囲がNF70での標識により過小評価されると考える理由が存在する。というのは、NF70との免疫反応性は移植片軸索の完全長にわたってはつきりとは発現されていないからである。同じ脳での、70kD

のウシ神経フィラメント抗体の軸索染色とチ

ロシンヒドロキシラーゼ (TH) 抗体を使用する軸索染色との比較は、70kD神経フィラメントの抗体がTH免疫組織化学で明視化され得る末端軸を染色し損なうことを示す (ウィクトリン (Wictorin, K.) とビョルクlund (Bjorklund, A.) (1992) ニューロレポート (Neuroreport) 3:1045-1048)。線条体移植片からの末端軸を示す独立の軸索マーカーを欠くため、軸索の樹枝状分岐がNF70免疫組織化学により明視化される軸索のその部分よりさらに伸長するかどうかは証明されていない。

8週齢の移植片は軸索の長距離の成長を示すが、しかし、ヒト線条体の異種移植片について報告された軸索の長距離の成長 (ウィクトリン (Wictorin, K.) ら (1990) ネイチャー (Nature) 347:556-558) とは異なり、NF70-IRの移植片の軸索は尾側では黒質までは観察されない。しかしながら、この研究での移植後の最長の生存はヒト線条体異種移植片での25週間に比較して16週間であり (ウィクトリン (Wictorin, K.) ら (1990) ネイチャー (Nature) 347:556-558; ウィクトリン (Wictorin, K.) ら (1992) J. Comp. Neurol. 323:475-494; ウィクトリン (Wictorin, K.) とビョルクlund (Bjorklund, A.) (1992) ニューロレポート (Neuroreport) 3:1045-1048)、そのため軸索の成長の期間の差異が、部分的に、ヒト異種移植片の軸索のより大きな伸長の原因でありうる。ブタ異種移植片に匹敵する移植後の発生の時間が、これら2個のドナー種からの移植片の軸索の成長能力の明白な比較に必要とされるであろう。

ヒトおよびブタ双方の異種移植片からの軸索の長距離の成長の主要パターンは、脳梁、内包および前方交連の線維束による同調化を必要とする。これらの路内では、移植片軸索およびCD44-IRのグリア線維の双方が宿主線維との平行な整列で伸長する傾向を示す。いくつかの場合

には、脳梁内では移植片からの軸索の距離が1cmに到達する。宿主のミエリン化された線維路に従う移植片の遠心性神経線維の傾向もまた、ヒト線条体異種移植片 (ウィクトリン (Wictorin, K.) ら (1990) ネイチャー (Nature) 347:556-558)、

マウス線条体異種移植片およびラットのドーパミン細胞を枯渇させた中脳に置かれたヒト腹側中脳異種移植片からの軸索（ウィクトリン(Wictorin, K.)ら (1992) J. Comp. Neurol. 323:475-494) について報告される。

脳梁および前方交連への明らかに非特異的な移植片軸索の突出に加え、いくつかのNEF 70-I Rの線維が大腦皮質の下層に進入しているのもまた見られる。ウィクトリン(Wictorin, K.)ら (1990)ネイチャー(Nature)347:556-558) もまた、これらの同じ白質構造を通りかつ大腦皮質内へのヒト線条体の異種移植片からの長距離の軸索の生長を示す。典型的でない成長の軌跡は移植片中の若干の非線条体細胞タイプの存在を指摘し得るであろうが、しかしながら、この研究での胎児神経節隆起の精密に制限された切開はそうした汚染を最小限にしているはずである。このような成長パターンはまた、異種移植片軸索の成長は正常なラット軸索の成長よりもより特異的でないことも示唆しうる。しかしながら、異種移植片での同様の成長の傾向は、ドナーの軸索に特異的なマーカーの欠如のために気づかれずに消えてしまったようである。にもかかわらず、広汎な非特異的な突出はマウスからラットへの線条体移植片について報告されなかった（ウィクトリン(Wictorin, K.)ら (1988) Prog. Brain Res. 82:391-399)。軸索の成長の非特異性の若干の程度は、しかしながら、多数の前脳システムからの遠心性神経の初期の生長の通常の特徴であり、そしてその後にこれらの非特異的な軸索の側枝の大きな画分

が取り除かれて成体での接続の模倣を産生する期間が続く（オレアリイ(O'Leary, D.D.M.)とケスター(Koester, S.E.) (1993) ニューロン(Neuron)10:991-1006を参照)。ブタおよびヒトの移植片からの比較的より活発な軸索の成長は、それらのラット宿主に比較してこれらのドナー種の細胞の延長された発生によるこれらの非特異的な成長パターンの強調因子を反映しうる。加えて、正常な胎児脳の成長環境と成体脳内で発生する胎児移植片のそれとの間の多くの差異が、これらの解釈をさらに複雑にする。成体脳は、ミエリン化された線維路のような、正常の胎児の発生の中に存在しない成長の合図を提供しうる。これが移植片軸索の成長の軌跡を一方に偏らせうる。

宿主線維路への移植片軸索の優先的な伸長は軸索誘導のメカニズムに関する他の問題を生じさせる。ミエリンに関連した軸索の成長を阻害する物質の立証（カローニ(Caroni, P.)とシュワブ(Schwab, M.E.) (1988) ニューロン(Neuron)1:85-96; シュワブ(Schwab, M.E.) (1990) Trends Neurosci. 13:452-455) にもかかわらず、再生および移植片の多数の他の研究はミエリン化された線維路に沿った軸索の成長に対する好みを示している（ウィクトリン(Wictorin, K.)ら (1990) ネイチャー(Nature)347:556-558; ウィクトリン(Wictorin, K.)ら (1992) J. Comp. Neurol. 323:475-494; ウィクトリン(Wictorin, K.)とビョルクlund(Bjorklund, A.) (1992) ニューロレポート(Neuroreport)3:1045-1048)。匹敵するもの(parallels)もまた、異所性に移植された末梢神経線維路の中樞神経系の軸索の成長を高めもしくは導く能力（アガヨ(Aguayo, A.J.)ら (1984) Neurosci. Lett. 45:53-58; ベンフェイ(Benfey, M.)とアガヨ(Aguayo, A.J.) (1982) ネイチャー(Nature)296:150-152; デイ

ヴィッド(David, S.)とアガヨ(Aguayo, A.J.) (1981) サイエンス(Science)214:931-933; ゲイジ(Gage, F.H.)ら (1985) Exp. Brain Res. 60:584-589)、および中枢神経系組織（デュネ(Dunnett, S.B.)ら (1989) Exp. Brain Res. 75:523-535; クロマー(Kramer, L.F.)ら (1981) Brain Res. 210:173-200) もしくは培養されたシュヴァン(Schwann)細胞（クロマー(Kramer, L.F.)とコーンブルックス(Cornbrooks, C.J.) (1985) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (proc. Natl. Acad. Sci. USA)82:6330-6334; モントゴメリー(Montgomery, C.T.)とロビンソン(Robinson, J.A.) (1993) Exp. Neurol. 122:107-124) の移植のそれにより再生する軸索が離れた標的にまで成長し得る架橋を提供する能力において見出され得る。移植片グリア細胞および宿主白質中の移植片軸索に加えての線維の存在は、線維路内への軸索の成長がこれらの細胞タイプ間の支持的な成長の関連に依存しうることを示唆する。そうしたグリアの支持の存在は、軸索がミエリン化された組織内で阻害シグナルに打ち勝つのを助けうる。胚グリア細胞は最初の軸索誘導に直接関与し得る（バスチアニ(Bastiani, M.J.)とグッドマン(Goodman, C.S.) (1986) J. Neurosci. 6:3542

-3551; ジェイコブス (Jacobs, J.R.) とグッドマン (Goodman, C.S.) (1989) J. Neurosci. 9:2402-2411; シルヴァー (Silver, J.) ら (1982) J. Comp. Neurol. 210:10-29)。終脳の橈骨神経グリア (ラキック (Rakic, P.) (1981) Trends Neurosci. 4:184-187)、小脳のベルグマン (Bergman) グリア (ラキック (Rakic, P.) (1971) J. Comp. Neurol. 141:283-312)、および終脳の中線の構造的グリア (シルヴァー (Silver, J.) ら (1982) J. Comp. Neurol. 210:10-29; スミス (Smith, G.M.) ら (1986) J. Comp. Neur

ol. 251:23-45) は、正常な神経の移動および軸索の成長に不可欠な基質を提供する。発達する基底の終脳での橈骨神経グリアは、神経節隆起の脳室領域から端を発し、そして、神経の移動および突起の伸長の双方の基質を提供する発達する線条体の集合体を外尾腹側で通過する (ミッション (Mission, J.P.) ら (1988) Dev. Brain Res. 44:95-108; ハリデイ (Halliday, A.L.) とセプコ (Cepko, L.C.) (1992) ニューロン (Neuron) 9:15-26)。本胎児移植片で観察される初期のグリア細胞およびそれらの線維の伸長は、正常胎児の線条体原基の発達上一過性の橈骨神経グリア細胞に相同でありうる。

神経体は宿主組織の移植片の外側でほとんど見出されないにもかかわらず (リウ (Liu, F.C.) ら (1993) ニューロサイエンス (Neuroscience) 55:363-372)、胎児神経移植片からのグリアの移動は多数の研究で観察されている (エメット (Emmett, C.J.) ら (1991) J. Comp. Neurol. 311:330-341; ゴールドベルグ (Goldberg, W.J.) とバーンスタイン (Bernstein, J.J.) (1988) J. Neurosci. Res. 20:38-45; ジャック (Jacque, C.M.) ら (1986) Dev. Neurosci. 8:142-149; ジャック (Jacque, C.M.) ら (1992) J. Neurosci. 12:3098-3106; スアード (Suard, I.M.) ら (1989) J. Neurosci. Res. 23:172-179; ゾウ (Zhou, H.F.) ら (1990) J. Comp. Neurol. 292:320-330; ゾウ (Zhou, H.F.) ら (1992) Exp. Neurol. 122:155-164; ゾウ (Zhou, H.F.) とルンド (Lund, R.D.) (1992) Brain Res. Dev. Brain Res. 65:127-131)。インビトロ研究は星状細胞が伸長する軸索の成長に支持的であり得ることを立証している (アード (Ard, M.D.) ら (1988) Soc. Neurosci. Abstr. 14:748; フォーセット (Fawcett, J.W.) ら (1989) Dev. Biol. 135:449-45

8; ノーブル(Noble, M.)ら (1

984) J. Neurosci. 4:1892-1903)。従って、移動する移植片グリアが移植片軸索の誘導に役割を演じるとみられることが示唆されている (リンゼイ(Lindsay, R.M.)とレイズマン(Raisman, G.) (1984) ニューロサイエンス(Neuroscience)12:513-530; マッケオン(McKeon, R.J.)ら (1989) Exp. Neurol. 103:213-221; スミス(Smith, G.M.)ら (1986) J. Comp. Neurol. 251:23-45)。例えば、リンゼイ(Lindsay)とレイズマン(Raisman)(1984)は「グリア細胞の移動の道筋はそれに沿って移植物の神経線維が宿主に浸透し得る経路を決定しうる」ことを示唆した。宿主脳内の移植片の外側の移植片軸索と移植片グリアとの間で観察される緊密な空間的関連はこの仮説に支持を加える。

移植片の発生が正常な発生の中の軸索の伸長および排除に関与する過程を反復する程度までは、これらの移植片で観察されるグリアと軸索の関連は、正常な発生および移植片の発生での軸索の成長過程に関する手掛かりを提供する。構造的グリアおよび胎児星状細胞は、発生の間、一過性の細胞タイプとなる傾向がある(レヴィット(Levitt, P.)とラキック(Rakic, P.) (1980) J. Comp. Neurol. 193:815-840; シュメヒェル(Schmechel, D.E.)とラキック(Rakic, P.) (1979) Anat. Embryol. 156:115-152; シルヴァー(Silver, J.)ら (1982) J. Comp. Neurol. 210:10-29; スミス(Smith, G.M.)ら (1986) J. Comp. Neurol. 251:23-45)。これらの移植片で同定されるドナー由来のCD44-IRの細胞が胎児線条体の一過性のグリア細胞に相同であるという可能性は、2個の観察により支持されるようである。すなわち、第一に、胎児の橈骨神経グリアもまたCD44-IRである(フォーゲル(Vogel, H.)ら (1992) J. Neurocytol. 21:363-373)。そして第二に、成体脳でのCD44-IRの低下

した発現および移植片の発生の中の神経領域に対するグリアの減少する比が存在する。発達する脳でのグリア誘導線維のように、CD44-IRの移植片グリア線維は移植片軸索の伸長の初期の段階の重要な支持的基質を提供しうる。これは、確立された機能性シナプスからの標的由来の向性の支持への到達を軸索が得る前

の初期の軸索の生長期の間にとりわけ重要でありうる（パーヴズ(Purves, D.)ボディ アンド ブレイン：ア トロフィック セオリー オブ ニューラル コネクションズ(Body and Brain: A Trophic Theory of Neural Connections)。(ハーヴァード大学出版局、ケンブリッジ、マサチューセッツ州(1988))）。正常な発生および移植片の発生の双方でのそうした支持的グリア線維のその後の排除は、その時点までに適切な標的シナプスを補充し損なった軸索の側枝の除去に寄与する因子でありうる（オレアリイ(O'Leary, D.D.M.)とケスター(Koester, S.E.) (1993) ニューロン(Neuron)10:991-1006)。

実施例2：修飾されたブタ線条体細胞の損傷されたラット脳への移植および移植された細胞の組織学的検査

実験デザインおよび処理群

体重300～350gmの82匹の成体雄性シュプラグドレー(Sprague-Dawley)ラット（チャールズ リバー ラボラトリーズ(Charles River Laboratories)、アメリカ合衆国）は、移植の1週間前に右新線条体にキノリン酸の一側性の定位注入を受けた。損傷されたラットは、線条体中に、ブタ胎児終脳の外側神経節隆起（LGE）から調製した線条体細胞懸濁液を移植された。5つの異なるブタ腹子それぞれ由来のLGE細胞懸濁液（E30-E40）を別個の外科的処置でラット宿主に移植した。74匹

の生存ラットを免疫抑制方法により3個の釣り合わせた群に分割した。第1群（ネガティブコントロール；N=14）では、動物はいかなる種類の免疫抑制も受けなかった。第2群で（N=29）では、移植された線条体細胞はブタMHC-Iに対するモノクローナル抗体のF(ab')<sub>2</sub>断片で前処理した。第3群（ポジティブコントロール；N=31）では、未処理の細胞を移植した動物をシクロスポリンA（CsA；10mg/kg；サンド ファーマシューティカルズ(Sandoz Pharmaceuticals)、イーストハノーヴァー、ニュージャージー州）の連日の皮下注入で免疫抑制した。全ての動物は術前に抗生物質セファロチン（ケフリン；10mg/kg；リリー インク(Lilly Inc.)、インジアナポリス、インディアナ州）の単回皮下投与で処理され、そしてその後、それらの飲料水中(250mg/l)にテトラサイクリン（パ

ナマイシン；20～40mg/kg/日；アップジョン(Upjohn)、カラマズー、ミネソタ州)を与えられた。C s A 処理した動物は毎週体重を測定し、また、それらのC s A 用量をそれに従って調整した。C s A の十分な血清濃度を確実にするため、C s A 処理した動物からの心内血液(灌流時に得られる)をラジオイムノアッセイによるC s A 濃度の測定に寄託した(デイモン ラボラトリーズ(Damon Laboratories)、ウエストウッド、マサチューセッツ州)。動物は異種移植片の組織学的分析のため移植3～4ヶ月後に灌流した。

#### ブタ胎児L G E の切開

授精の30ないし40日後、超音波で確認した妊娠家畜ブタ5匹を、タフツ大学獣医学部(グラフトン、マサチューセッツ州)で標準的な獣医学的処置に従い安楽死させた。選択的切開およびL G E 移植に適する妊娠齢の範囲は以前の研究で明らかにされた。ディーコン(Deacon, T.)ら(1

993) Soc. Neurosci. Abstr. 19:284.15。子宮角を無菌の様式で除去し、そして迅速に氷上で無菌実験施設に移送した。無菌実験施設で死亡した胎児を取り出しそして滅菌したダルベッコ(Dulbecco)のリン酸緩衝液処理生理的食塩水(P B S)に移した。頭から臀部までの長さ(27～35mm)の測定後、胎児を断頭しそして胎児脳を正中矢状切開により頭蓋から慎重に摘出した。L G E の切開は以前に記述されたように40倍の拡大下にダルベッコ(Dulbecco)のP B S 中で実行した。パクザバン(Pakzaban, P.)ら(1993) Exp. Brain Res. 97(1):13-22。簡単には、傍矢状切開を各半球の背面に沿って創造し、脳側室の腹側外側壁に内側および外側神経節隆起を露出させた。切開をその後円周状に完遂させ、半球の腹側外側壁(神経節隆起をもつ)を脳の残部から引き離した。半球の引き離した壁の外側(皮質)表面をその後切開用皿で平らにし、内側表面上に神経節隆起を露出させた。内側隆起は切除しそして廃棄した。今や脳側室の引き離された壁上に単離された外側隆起をその底部に沿って湾曲した微小ハサミで慎重に切除し、そして、フェノールレッドを欠いたカルシウムおよびマグネシウムを含まないハンク(Hank)の平衡塩溶液(H B S S ;シグマ(Sigma))を含有するペトリ皿に移した。一腹の全胎児からのL G E 組織断片を合わせた。

細胞懸濁液の調製およびF(a b')<sub>2</sub>処理

LGE組織断片をHBSS（シグマ(Sigma)）中0.5%トリプシン-EDTA 1 mlとともに37℃で10分間インキュベーションした。断片を新鮮なHBSSで4度洗浄し、その後、目に見える組織断片のない乳状の懸濁液が得られるまで、徐々に小さい内径の火で磨いたパスツールピペットの先端を通して穏やかに磨砕した。細胞数および生存能力をアク

リジンオレンジ/臭化エチジウム法により測定した。ブランディン(Brundin, P.)ら(1985) Brain Res. 331:251-259。各移植処置について細胞懸濁液のおよそ半分をF(a b')<sub>2</sub>処理した。F(a b')<sub>2</sub>断片は、イムノピュア(ImmunoPure)F(a b')<sub>2</sub>調製キット(ピアース(Pierce)、ロックフォード、イリノイ州)を使用し、ブタMHC-Iに対するモノクローナル抗体(PT85A; ヴェテリナリー メディシン リサーチ アンド デベロップメント インク(Veterinary Medicine Research and Development, Inc.)、プルマン、ワシントン州)の酵素的切断により調製した。LGE細胞を、間歇的に混合しながら4℃で30分間、HBSS中のF(a b')<sub>2</sub>断片(1 μgのF(a b')<sub>2</sub>/細胞10<sup>6</sup>個)とインキュベーションし、500RPMで5分間の遠心分離により沈降させ、そして未処理の細胞(第1群および第3群)の濃度に等しい濃度を得るように算出した体積のHBSS中に再懸濁した。最終の生存可能細胞数は、異なる腹子由来の細胞懸濁液で1 μlあたり細胞30,000から80,000個までに及んだ。

## 蛍光活性化細胞選別(FACS)

LGE細胞懸濁液中の細胞上のMHCクラスI抗原の存在をFACS分析により証明した。ベクトン-ディッキンソン(Becton-Dickinson)のFACSscanを使用した。当該LGE細胞懸濁液をインキュベーション緩衝液中20 μg/ml濃度のブタMHC-Iに対するモノクローナル抗体(PT85A; ラットのMHC-Iに対しては反応性でない。免疫組織化学を参照)と氷上で1時間インキュベーションした。このインキュベーション緩衝液は、0.5%ウシ血清アルブミンを含む、カルシウムおよびマグネシウムを含まないPBSから成った。細胞をその後インキュベーション緩衝液中で3度洗浄し、そしてインキュベーション緩衝液中1 μ

g/mlの濃度のヤギ抗マウス蛍光抗体（カペル(Cappel)、デューラム、ノースカロライナ州）と1時間インキュベーションした。ラット胎児LGE細胞およびブタ内皮細胞は、ブタMHC-IのPT85Aでの免疫標識のそれぞれネガティブコントロール、ポジティブコントロールとしてはたらいだ。それぞれの場合に、PT85Aによる細胞の特異的蛍光標識を、一次抗体を割愛した場合の細胞の非特異的標識と比較した。

#### 損傷および移植外科手術

ラットをペントバルビタール（65mg/kg）の腹腔内注入により麻酔し、そしてコフ(Kopf)の定位枠に設置した。26Sゲージ針（内径／外径＝0.11mm／0.46mm）を備えつけた5 $\mu$ lのハミルトンシリンジを使用して、キノリン酸120ナノモル（1 $\mu$ l）を各動物の右新線条体内に（前頂に関しての座標：前方＝＋1.0mm、外側＝－2.5mm、腹側＝－4.5mm、切歯バー－2.5mm）1分間かけて送達させた。針は追加の1分の後取り除いた。7日後、キノリン酸で損傷した動物を以前の移植の準備でのように麻酔した。22Sゲージ針（内径／外径＝0.41mm／0.71mm）を備えつけた10 $\mu$ lのハミルトンシリンジを使用し、損傷に使用したと同じ座標で右新線条体に0.5 $\mu$ l/分の速度でLGE細胞懸濁液を慎重に送達した。第1～3群のラットを移植された全生存可能細胞量に基づき4群に交差分類した。すなわち、1匹あたり細胞80,000個（N＝11）、1匹あたり細胞150,000個（N＝22）、1匹あたり細胞200,000個（N＝25）、および1匹あたり細胞240,000個（N＝16）。

#### 灌流および組織の処理

移植の3ないし4ヶ月後、動物を灌流のための準備でペントバルビタールの過剰用量で終末的に麻酔した。動物を、ヘパリン－生理的食塩水

溶液（0.9%生理的食塩水1l中1000単位のヘパリン）で、その後100mMリン酸緩衝液（pH7.4）中4%パラホルムアルデヒド300～400mlで、左脳室を通して灌流した。脳を直ちに除去しそして同じ4%パラホルムアルデヒド溶液中で8時間、後固定した。後固定の後、脳をPBS（pH7.4）中30%ショ糖で平衡化させ、その後、凍結するミクロトーム上40 $\mu$ mの厚さで前脳を通り冠状縫合に沿って

切開しそしてPBS中に収集した。移植片からの軸索の生長の別の平面の検査には、選択した脳を40 $\mu$ mの厚さで矢状面で切開した。

6切片ごとに顕微鏡のスライドガラス上に固定し、そしてクレシルバイオレットで染色した。近接する切片はケレ(Koe11e)の方法に従ったアセチルコリンエステラーゼ(AC h E)組織化学を受けた。ケレ(Koe11e, G.B.) (1954) J. Comp. Neuro1. 100:211-235。簡単には、スライドガラスに固定した切片を、30mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.0、9 mM硫酸銅、16mMグリシン、4 mMヨウ化チオコリンアセチルおよび0.1mMエトプロパジンを含むインキュベーション溶媒中で6時間キュベーションした。インキュベーション後、スライドガラスを蒸留水で洗浄し、10%フェリシアン化カリウム中で発色させ、そして0.5%硫化ナトリウムに30~40秒曝すのに先立ち再度蒸留水中で洗浄した。

#### 免疫組織化学

免疫染色はアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法(ベクター ラブス(Vector Labs))により実施した。自由に浮遊する切片を、PBS中50%メタノールおよび3%過酸化水素で20分間前処理し、PBS中で3度洗浄し、そして振盪台上での一次抗体との一夜のインキュベーションに先立ちPBS中10%正常ウマ血清(NHS)中で60分間インキュベ

ーションした。この研究で使用した一次抗体およびインキュベーション緩衝液は、PBSで2000倍に希釈した分化抗原44のブタのクラスターのモノクローナル抗体(CD 44)、PBS中1%ウシ血清アルブミン、1% NHSおよび0.1%トリトンX-100で40倍に希釈した神経フィラメント70kDaに対するモノクローナル抗体(NF 70; バイオデザイン(Biodesign)、ケンネブunkポート、メリーランド州)、PBS中1% NHSで50倍に希釈したラット白血球共通抗原に対するモノクローナル抗体(OX 1; アキュレート(Accurate)、ウェストベリー、ニューヨーク州)、PBS中1% NHSおよび0.1%トリトンX-100で50倍に希釈したラット補体レセプター3に対するモノクローナル抗体(OX 42; アキュレート(Accurate)、ウェストベリー、ニューヨーク州)、およびPBSで1000倍に希釈したブタMHC-Iに対するモノクローナル抗体(P T 85A; VMRD インク(VMR

D Inc.)、プルマン、ワシントン州)より成った。P B S中10分間の1度のすすぎおよび5% N H S中10分間の2度の洗浄の後、切片を、P B S中2% N M Sで200倍希釈のビオチニル化ウマ抗マウス抗体(ラットに吸着される；(ベクター ラブス(Vector Labs))中、室温で60~90分間インキュベーションした。当該切片をその後、P B S中で3度すすぎ、そしてP B S中アビジン-ビオチン複合体(ベクタスタチンA B Cキットエリート(ELITE)；(ベクター ラブス(Vector Labs))中、60~90分間室温でインキュベーションした。P B Sおよびトリス緩衝液処理生理的食塩水での十分のすすぎの後、切片を、トリス緩衝液処理生理的食塩水中0.04%過酸化水素および0.05% 3, 3'-ジアミノベンジジン(Sigma)中で発色させた。一次抗体の割愛のあるコントロールを選択した切片で実行して染色の特異性を証

明した。

C D 44、N F 70およびP T-85A抗体はブタ組織を認識するがラット組織は認識せず、そのためブタからラットへの異種移植片でのドナー特異的マーカーとして使用した。C D 44およびN F 70は、以前に記述されたように、それぞれドナーのグリアおよびニューロンのマーカーとして使用した。ディーコン(Deacon, T.W.)ら(1993) Soc. Neurosci. Abstr. 19:284.15。O X 1はリンパ球および活性化された小グリア細胞を標識するのに使用した。フィンゼン(Finsen, B.R.)ら(1991) J. Neuroimmunol. 32:159-183。O X 42はマクロファージ、顆粒球および小グリア細胞を標識するのに使用した。フィンゼン(Finsen, B.R.)ら(1991) J. Neuroimmunol. 32:159-183。

#### 形態計測分析

移植片の体積の定量化は以前に記述されたようなコンピュータ画像分析(マッキントッシュのイメージ(Image)v. 1.44)の助けを借りて実行した。パクザバン(Pakzaban, P.)ら(1993) Exp. Brain Res. 97:13-22。簡単には、顕微鏡像をコンピュータ画面に映し、そして移植片の境界をビデオの顕微鏡像上に重ね合わせた目盛りをつけた画像分析ウインドウ中でなぞった。それぞれの複写により囲まれた面積の自動計算の後、横断面積を移植片の吻から背の伸長を横切って積分し

、移植片の体積を得た。

#### ブタLGE細胞上のMHC-Iの発現

ブタLGE細胞上のMHC-Iの発現はブタMHC-Iに対するモノクローナル抗体(P T<sup>85</sup>A)を使用するFACS分析により確認した。簡単には、ブタ外側神経節隆起細胞(LGE)、ラットLGE細胞(ネ

ガティブコントロール)およびブタ内皮細胞(ポジティブコントロール)のFACS分析に対応する蛍光強度ヒストグラムを得た。黒と灰色のヒストグラムは一次抗体の存在下もしくは非存在下で実行したFACS分析に対応した。P T<sup>85</sup>Aの存在下での蛍光シグナルのバックグラウンドの蛍光(P T<sup>85</sup>Aの非存在下)との比較は、蛍光強度ヒストグラムの右方へのシフトを示した。特異的標識の閾値をバックグラウンドの蛍光強度の95%と定義した場合には、細胞の20.1%がP T<sup>85</sup>Aにより特異的に標識されることが見出された。蛍光強度ヒストグラムの大きなシフトは、ラットLGE細胞(ネガティブコントロール)をP T<sup>85</sup>Aで標識した場合に観察されなかった。対照的に、ブタ内皮細胞(ポジティブコントロール)の99.6%はP T<sup>85</sup>Aで特異的に標識された。

#### 線条体異種移植片の生存および大きさに対するMHC-I遮蔽の影響

移植3~4ヶ月後の線条体異種移植片の生存を、それぞれドナー由来のニューロンおよびグリア要素のマーカーであるブタNF<sup>70</sup>およびCD<sup>44</sup>についての免疫染色により評価した。F(a b')<sub>2</sub>処理した動物の29移植片中15個が生存し、一方、非免疫抑制動物では14移植片中1個のみであった(第9図)。MHC-I遮蔽後の移植片の生存の改善は、ピアソン(Pearson)の $\chi^2$ 解析により有意であることが見出された( $P < 0.005$ 、 $\chi^2 = 8.03$ 、d f = 1)。同様に、CsA処理後の移植片の生存(23/31)は免疫抑制の非存在下でのそれより有意に大きかった( $P < 0.001$ 、 $\chi^2 = 17.42$ 、d f = 1; 第9図)。F(a b')<sub>2</sub>処理群とCsA処理群との間の移植片の生存での差異は統計学的に有意ではなかった( $P > 0.05$ 、 $\chi^2 = 3.26$ 、d f = 1)。重要なことに、後者の群でのCsAの血中濃度(832~1309  $\mu$ g/l; 平均 $1175 \pm 115 \mu$ g/l)は均一に治療上2~3 lで

あった。

移植片の体積の定量化はF(a b')<sub>2</sub>処理群およびC s A処理群のより詳細な比較を可能にした(第10図)。F(a b')<sub>2</sub>処理した動物での平均移植片の体積( $1.07 \pm 0.30 \text{mm}^3$ ; 平均±標準誤差)は、C s A処理した動物でのそれより小さかった( $3.14 \pm 0.51 \text{mm}^3$ ;  $P < 0.005$ ,  $t = 3.06$ ,  $df = 36$ ; 非ペアード(unpaired) t 検定)。各処理群での移植された細胞投与量の移植片の体積に対する影響について制御するため、分散の2方向解析を実行した。F(a b')<sub>2</sub>処理群とC s A処理群との間の移植片の体積での差異は有意のままであった( $P < 0.05$ , F比=5.24,  $df = 1$ )。が、移植片の体積に対する細胞投与量の影響は、検討した投与量範囲で統計学的有意に到達しなかった( $P > 0.05$ , F比=0.33,  $df = 3$ )。F(a b')<sub>2</sub>およびC s Aで処理した線条体異種移植片の細胞構造体系的組織化

線条体異種移植片の内部の組織化がF(a b')<sub>2</sub>処理により変化するかどうかを決定するため、F(a b')<sub>2</sub>処理した移植片の細胞組成をC s A処理した移植片のそれと比較した。ニッスル染色した切片上では、双方の群の移植片はより小さな細胞の索状組織により囲まれる大きなニューロン様細胞の多数のクラスターから成った。大きな細胞のクラスターのニューロン(および線条体)の表現形は、近接する切片上のこれらの領域とAChE陽性領域との間の精密な一致により確認された。若干のニューロンのクラスターはAChE染色の混合した密度を表し、これはこれらの成熟するブタ移植片中のAChEの最近の発現に矛盾しなかった。ディーコン(Deacon, T.W.)ら(1993) Soc. Neurosci. Abstr. 19:284.15。近接する切片上のNF70およびCD44の免疫染色の比較は、F(a b

)<sub>2</sub>およびC s Aで処理した動物の双方での移植片のNF70との免疫反応性(NF70-IR)のニューロン成分およびCD44-IRのグリア成分の矛盾しない分離を示した。双方の群で、NF70-IRの領域はAChE陽性のニューロンのクラスターに対応し、一方、CD44-IRのグリアはニューロンのクラスターを取り囲みかつ分離する索状組織に沿って分布した。移植片の細胞構造体系的組織化は双方の群で同様であったが、NF70-IRの要素の相対比はC s A処理した移植片でより大きいようであった。

選択した移植片でのブタMHC-Iについての免疫染色は、生存する異種移植片の周辺でのドナーMHC-Iの持続する発現を示した。重要なことに、ドナーMHC-Iの発現パターンは双方の処理群でドナー由来のCD44IRのグリアの分布に対応した。NF70-IRのニューロンのクラスターでは近接する切片でのMHC-Iの発現が全くなかった。若干の脳（3群全てで）では、壊死的移植片レムナントがニッスル染色された切片で検出された。無傷の宿主線条体白質路の間に散在したこれらの領域は、ニッスル染色上、小さな細胞で浸潤されていた。近接する切片のOX1（リンパ球および活性化された小グリア細胞を標識する）およびOX42（マクロファージおよび小グリア細胞を標識する）での免疫染色は、これらの領域での宿主の免疫細胞および／もしくは活性化された小グリア細胞の蓄積の部分的に重なり合うパターンを示した。免疫浸潤ははっきりと限局され、かつ、線条体白質路および移植片の残存すニューロンの豊富な部分のほとんどを残していた。

F(ab')<sub>2</sub>およびCsA処理した線条体異種移植片からの軸索の生長

F(ab')<sub>2</sub>処理した移植片の宿主脳内への軸索の伸長能力を、選択した

矢状切開した脳でのブタNF70での免疫染色により、CsA処理した移植片のそれと比較した。豊富なNF70-IRの突起は、CsAおよびF(ab')<sub>2</sub>処理した動物の双方で、線条体内の移植片の尾極から端を発し、そして宿主の淡蒼球および中脳の方に尾側にさらに伸長した。双方の群での標的に向けられた生長は他の方向での軸索の生長に卓越した。CsA処理した移植片でと同じように、F(ab')<sub>2</sub>処理したニューロンに端を発する軸索は宿主内包に沿って3mmまで伸長した。

これらのデータは、ドナーMHC-Iに対するF(ab')<sub>2</sub>抗体断片での異種胎児神経細胞の前処理が、非免疫抑制コントロールに比較して神経の異種移植片の生存を大きく高めることを示す。F(ab')<sub>2</sub>処理した異種移植片は、CsA処理した移植片より小さいにもかかわらず、典型的な線条体異種移植片の細胞構造体系的組織化を表し、かつ、標的に向けられた長距離の軸索の生長についての能力を維持した。

### 実施例3：損傷されたサル脳でのブタ線条体細胞の移植および移植された細胞の機能的分析

#### 定位外科手術

ニューイングランド地域霊長類研究センター(New England Regional Primate Research Center) (NERPRC、サウスボロ、マサチューセッツ州、アメリカ合衆国)で繁殖した、体重2.5~3.5kgの5匹の雄性アカゲザル(マカカ ムラタ(Macacamulatta))は、NERPRCの外科施設で行われた8回の手術処置でキノリン酸(QA)の定位の線条体内への注入を受けた。それぞれのサルの定位座標は術前のMRIの検討に基づき決定した(下を参照)。各手術に先立ち、動物を鎮静し、そしてケタミン(10mg/kg、筋肉内)、キシラジン(1mg/kg、筋肉内)、アトロ

ピン(0.05mg/kg、筋肉内)、およびケフリン(10mg/kg、筋肉内)を前投薬した。1.0%イソフルランでの一般的な気管内麻酔の導入の後、動物をコフ(Kopf)の定位枠に仰臥位に置いた。耳バーおよび眼窩バーは、下位眼窩縁から外耳道まで広がる平面(眼窩道面)が水平面に平行でかつ注入の組み立て(assembly)の軸に直行であるように調整した。枠内の頭蓋の対称的配置は3面でのX線により確認した。重要なことに、術前に得られたMRI像もまた眼窩道面に垂直に向いており、かように線条体の標的のMRI座標の定位枠の座標への移行を容易にした。

頭皮の進入部位の上に横たわる手術場所を抗菌溶液で調製し、そして無菌ドレープで分離した。修飾した22ゲージ針(長さ3インチ、外径0.028インチ、内径0.016インチ、斜角45°)に取りつけた20 $\mu$ lハミルトンシリンジから成る注入の組み立てをキノリン酸で満たし、そして枠上に固定した。QAはリン酸緩衝液(pH7.4)中200mMの濃度で調製し、50 $\mu$ lのアリコートとして-20℃で保存し、そして手術の間は氷上で保存した。頭蓋を5cmの矢状縫合の頭皮切開で露出させ、そして2×2cmの頭蓋局部切開を予期される針の進入部位に創造した。下にある硬膜を分割して軟膜表面を露出させた。注入の組み立てを、3次元でのMRIの参照点として外耳道、矢状静脈洞および軟膜表面を使用して術前のMRIに基づき算出した定位の標的部位まで低下させた。QAは2分あたり1 $\mu$ lの速度で

注入し、その後針の取り除きの前に2分間待機した。全体で $Q A 10_{\mu}^1$  (2マイクロモル) を各標的部位で2個の注入路に沿って注入した。初期の標的部位は、M12およびM14での右尾状核、M15での右吻側被殻、およびM16での右尾側被殻から成った。最初の損傷の設定のおよそ2ヶ月後、M12は右吻側被殻に付加的損傷を受け、また、M

14およびM15は右尾側被殻に付加的損傷を受けた。M17は1回の処置で尾側被殻を両側性に損傷した。5匹のサルでの尾状核の標的の定位座標は以下の範囲にわたって分布した。すなわち、耳バーに関して前方18~22mm、矢状縫合に関して外側4~6mm、そして軟膜表面に関して腹側13~15mm。同様に、吻側および尾側の被殻の標的の座標の範囲は、それぞれ、A:17~22、L:10~12、V:16~17、およびA:11~16、L:12~14、V:17~19であった。一連の注入の終了時に頭皮を縫合して閉じ、そして動物を覚醒させかつそのケージにもとした。

#### 磁気共鳴画像法

それぞれのサルは、最初の外科手術に先立ち、また各損傷手術の1~2ヶ月後、T1およびT2加重MR画像法を受けた。MRIの検討は、GE シグナ(Signa)1.5テスラ画像システムを使用し、鎮静した動物(ケタミン/キシラジン、15/1.5mg/kg、筋肉内)で実行した。動物は仰臥位に置き、それらの頭をリストコイル内にしっかりと置いた。眼窩道面(上記参照)を、最初に、矢状縫合探索T1加重画像で輪郭を描いた。偽冠状縫合T1加重画像をその後、3.0mmの厚さの薄片、300m秒の反復時間(TR)、および20m秒のエコー時間(TE)で、フランクフォルト(Frankfort)平面に垂直な薄片の方向で得た。T2加重のダブルスピンエコー画像は、同じ方向で、TRは3000m秒、また、TEは第一エコーおよび第二エコーについてそれぞれ40および80m秒で得た。

#### 陽電子放射断層法

リガンド $^{11}C-SCH$ を、ベンゾナフタゼピン(シェーリング(Schering)化合物39166)の直接の $^{11}C$ -ヨウ化メチルでのメチル化により合成した。簡単には、 $^{11}C$ -ヨウ化メチルを、0.1mlの $CH_3CN:DMF$

(9:1) 中のN-デメチル化された前駆体 (ノルーSCH) の $100\mu\text{g}$ のアリコートと反応させ、そして活性を溶媒の蒸発の後リングル乳酸緩衝液中に溶解した ( $>600\text{Ci}/\text{nmol}$ )。精製および分析は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用して実行した。PET測定は、 $360\text{BGO}$ 検出器 (FWHM解像度:  $4.5\text{mm}$ ; 感度:  $46,000\text{Hz}/\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ) の1個のリングを装備した高分解能PETスキャンニングシステム (PCR-I) を使用して実行した。放射データは実験の終了まで (90分) のトレーサー注入時間から得た。鎮静したサル (ケタミン/キシラジン、 $15/1.5\text{mg}/\text{kg}$ , 筋肉内) は頭部ホルダー内に頭を固定して仰臥位に置いた。7個の断層平面 (尾状核および被殻を通る5個の水平面ならびに小脳を通る2個の水平面) を、耳バーを含有する正面の平面の10、15、20、25および $30\text{mm}$ 前方ならびに5および $10\text{mm}$ 後方に配置された予め決められた位置で、被験体のベッドを動かすことにより、連続して検討した。データはファルデ (Farde) ら (1986) サイエンス (Science) 231:258-261およびセドヴァル (Sedvall, G.) ら (1991) Ann. Neuro[. 32:358-364に従って定量化した。

#### 行動分析

研究の開始時に、全動物を、全体で6時間を分割した期間で、 $1.5\text{m} \times 1.5\text{m} \times 1.5\text{m}$ のプレキシガラスフィルムで覆ったケージに慣らした。動物はその後、QA損傷手術の前と後の双方に3週間の間隔で、このケージ中でビデオ撮影した。各回とも、動物を最初に20分間フィルムで覆ったケージに慣らさせ、その後10分間刺激せずに (薬物のない状態) 撮影し、そして最後にアポモルヒネ ( $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 筋肉内) を投与しそしてさらに30分間撮影した。これは自発運動性行動およびジスキネジーを引き起こす

ようデザインされたドーパミン作働性刺激後の行動の双方の評価を可能にした。観察者は、実際のビデオ撮影の間、動物の行動に対する外的影響を最小限にするよう、存在しなかった。ビデオテープは、後で2名の独立した観察者により検分された。この観察者は、失調性体位、四肢の攣縮、衝撃性運動、舞踏病状およびアテトーシス様の運動、頭部および首の捻転、体幹のねじれ、および骨盤の回転を包含する異常な不随意運動 (ジスキネジー) の全ての症状発現の数および持続

時間を記録するよう指導された。記録は、P Pにより書かれたマッキントッシュのハイパーカードに基づくプログラム（ハイパーモンキー(Hypermonkey)2.0)の助けで容易にされた。30分間の撮影中、サルがアポモルヒネ誘発性のジスキネジー状態で過ごす時間全体（秒数で）を、その回のサルのジスキネジースコアとして定義した。ジスキネジーの持続時間はその後、P E TおよびM R Iの検討に基づく動物の線条体内の興奮神経毒性の損傷の場所との相互に関連させた。

#### Q A 損傷の解剖学的位置推定

それぞれのサルの線条体中のQ A 損傷の場所および程度は、線条体のドーパミン受容性(dopaminergic)ニューロンの損失の指標としてD<sub>1</sub>レセプター結合での減少を使用し、M R 画像法および定量的P E T分析により評価した。ブラウネル(Brownell, A.-L.)ら (1994) Exp. Neurol. 125:41-51。興奮神経毒性の領域のM R シグナルは、損傷後の最初の月にはT<sub>1</sub>加重画像上で低強度から高強度まで展開したが、しかし、全てのT<sub>2</sub>加重画像上では高強度であり、以前の報告に矛盾しなかった。ハントレイ(Hantraye, P.)ら (1992) プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス U S A (Proc. Natl. Acad. Sci.

USA) 89:4187-4191。全例で、損傷の意図された位置、T<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>加重画像上のM R シグナルの場所、ならびにP E TによるD<sub>1</sub>レセプター結合の局所的枯渇の間に優れた相関が存在した。全ての損傷は、広がりか焦点的であることが見出され、3個の領域すなわち尾状核頭部（例えばM<sub>12</sub>）、被殻の前半分（例えばM<sub>15</sub>）もしくは被殻の後半分（例えばM<sub>16</sub>）のうちの1個に限られた。3個の代表的な例でのP E Tデータの定量化は、無傷の反対側に比較して、それらのそれぞれの領域でのD<sub>1</sub>レセプター結合で類似の枯渇を示した。尾状核頭部での損傷は、示された5 mmの薄片でD<sub>1</sub>レセプター結合の18%の枯渇を示した。前方被殻への損傷の後、被殻のD<sub>1</sub>レセプター結合の26%の損失が前方の薄片で観察された。最後に、後方被殻への損傷はこの後方の5 mmの薄片で27%のD<sub>1</sub>レセプター結合での被殻の枯渇を生み出した。この定量化は選択的損傷はおおまかに大きさに等価であることを確認した。

顕著な自発的もしくはアポモルヒネ誘発性のジスキネジーを呈しなかった動物は、最初の損傷後約2ヶ月に異なる線条体領域に第二の損傷を受けた。とりわけ、尾状核頭部に損傷のある2匹の動物(M12およびM14)は、前方被殻(M12')もしくは後方被殻(M14')に第二の損傷を受け、また、前方被殻に最初の損傷をもつ1匹の動物(M15)は後方被殻に第二の損傷を受けた(M15')。後方被殻に最初の損傷のある1匹のジスキネジーの動物は第二の損傷を受けなかった(M16)。損傷のこれらの7個の設定に対応する行動データに基づき(以下を参照)、後方被殻での両側性の選択的QA損傷の運動性行動に対する影響を1匹の動物(M17)で検討した。

選択的な一側性の線条体損傷の運動性行動に対する影響

一側性に損傷された全ての動物は損傷手術の直後に困難なく摂食および毛づくろいが可能であり、また、いずれも不全片麻痺もしくは痛覚鈍麻の兆候を表さなかった。アポモルヒネの非存在下では、動物は損傷後の最初の1週間に、軽度の一過性のジスキネジー攣縮または反対側の腕もしくは脚の失調症体位を様々に表したが、しかし全てのそうした自発的運動は2週目までに消失した。若干の動物(M12、M14およびM16)は一側への自発的回転の好みを発生したが、しかし回転の方向は異なる動物で異なり、また、1匹の動物で時間とともに変わり得た。例えば、M14は、右尾状核損傷後の最初の14日の連日の10分間の観察時間に、左(損傷の側の反対側)への125~180回の完全な回転を表した。対照的に、M12は右尾状核損傷後2日目には71回の反対側への回転(10分あたり)を、4日目には10回の同側への回転を、10日目には243回の同側への回転を(ピーク)そして14日目には142回の同側への回転を表した。

自発的ジスキネジー運動は第1週後に消失したにもかかわらず、一時的ジスキネジー状態はアポモルヒネ投与により常に誘発され得た。無傷の動物ではアポモルヒネ誘発性のジスキネジーは存在しないかもしくは短時間かのいずれかであった。無傷の動物でのこうしたジスキネジーの累積持続時間は1800秒の試験間隔で84秒を越えなかった。尾状核損傷のある2匹の動物のうち、M12はアポモルヒネ誘発性のジスキネジーを表さなかったが、一方、M14は短時間の左脚の失調症体

位をはっきりと表示した。尾状核損傷への前方被殻の損傷の追加はジスキネジーを生み出さなかった (M12') が、一方、尾状核損傷のある動物での後方被殻の損傷の追加 (M14') は、顕著な攣縮および全ての四肢の持続的失調症、体幹の間歇性のねじれ、首の捻転、ならびに不規則な頭部運動により特

徴づけられる、著明な持続するアポモルヒネ誘発性のジスキネジーを生み出した。同様に、最初の尾状核損傷の非存在下では、孤立した前方被殻の損傷はジスキネジーを生み出さなかった (M15) が、一方、選択的な後方被殻の損傷は、全ての四肢の著明な不規則な攣縮および尾の失調症を生み出した (M16)。興味深いことに、後方被殻の損傷の存在はアポモルヒネ誘発性のジスキネジーの発生と関連したにもかかわらず、先の前方被殻の損傷のある動物への後方被殻の損傷の追加はジスキネジー症候群を生み出せなかった (M15')。

#### 選択的な両側の後方被殻の損傷

一側性に損傷された動物と対照的に、両側性に損傷された動物 (M17) は損傷後の最初の48時間に著明な自発性のハンチントン様の運動を呈した。この動物は全ての四肢での正常な強さおよびよく保存された申し分ない運動協調 (食餌ペレットへの到達により評価される) を有するようには見えたと、隣接する四肢の運動の乏しい協調、腕の間歇的伸長、前腕および手首の不規則な曲がり、失調症、骨盤の回転、体幹の捻転、口顔のジスキネジー、および軟食を必要とする咀嚼運動の協調不能を表した。この研究で観察された全ての異常な運動性行動のうち、この両側性に損傷された動物での異常な自発的運動の型は、ハンチントン病の特徴を示す舞蹈病失調症運動に最も密接に似ていた。この自発的運動性症候群は損傷後第3日までに消散し、そして動物は食餌ペレットを咀嚼しかつ毛づくろいする能力を回復した。アポモルヒネ誘発性の運動性症候群は、しかしながら、存続しかつ迅速なジスキネジー性運動および短時間の舞蹈病の症状発現により特徴づけられた。

#### サル脳の損傷された領域への線条体細胞の移植

薬理的免疫抑制 ( $\text{F}(\alpha\beta')_2$  断片) を使用するブタ線条体細胞の修飾もしくは

シクロスポリン投与のいずれか)と共に、妊娠30日後、外側神経節隆起から得た約100万個の神経細胞を含有するブタ胎児細胞懸濁液を、サルM15、M16およびM18の損傷部位に移植した。サルM15およびM18にはF(a b')<sub>2</sub>処理線条体細胞を移植した。サルM16には非F(a b')<sub>2</sub>処理線条体細胞を移植したが、しかし、移植の1日前に開始したシクロスポリンで処理した。

移植前および移植後4ヶ月のサルM15およびM16のPET像を上記に記述されたように創製し、そして第11図に示す。第11図に示されるように、移植後、双方の動物の損傷された側でPETシグナルの増大が存在する。

サルM16およびM18はその後、上で記述されたように、アポモルヒネ誘発性のジスキネジーにより測定されるような行動欠損について試験した。ジスキネジーの測定は移植の前および後の双方で行った。これらの試験結果は第12図および第13図にグラフの形態で示される。第12図に示されるように、サルM16での回復は移植後2ヶ月で観察され、そして移植後4、6、9、および13ヶ月で継続していた。第13図に示されるように、サルM18での回復は移植後6ヶ月で観察され、そして移植後9ヶ月継続していた。

実施例4：損傷されたラット脳へのブタ腹側中脳細胞の移植ならびに移植された細胞の組織学的および機能的分析

損傷外科手術、行動試験および実験群

成体の雌性シュプラグドレーイ(Sprague-Dawley)ラットは、10 $\mu$ lハミルトンシリンジを使用する内側前脳束中の2個の部位での6-OH

DA (3.6 $\mu$ g/ $\mu$ l 生理的食塩水中0.02%アスコルビン酸)の定位注入(1部位あたり2.5 $\mu$ l)による一側のドーパミン(DA)を枯渇する損傷を受けた(前頂に関しての座標：AP=-4.0、L=-0.8、V=-8.0、切歯バー=+3.4；AP=-4.4、L=-1.2、V=-7.8、切歯バー=-2.4)。6-OHDAは1 $\mu$ l/分の速度で注入し、そして針は取り除くのに先立ちさらに2分間その場所に残した。全ての手術はコフ(Kopf)の定位枠内でペントバルビタールナトリウム(65mg/kg、腹腔内)麻酔下に行った。損傷後3週に、ラットを、自動回転計(サンディエゴインストゥルメンツ(San Diego Instruments)を使用してアンフェタミン誘

発性 (5mg/kg、腹腔内) の回転の非対称性について試験した。ウンガーシュテット (Ungerstedt, U.) ら (1970) Brain Res. 24:485-493。

およそ97%のDA枯渇を反映する (シュミット (Schmidt, R.H.) ら (1982) J. Neurochem. 38:737-748) 90分あたり800回転より多い正味の同側の回転 (反対側の回転を差し引いた同側の回転) のある24匹のラットを、移植前の回転スコアに関して釣り合わせた2個の実験的異種移植群に分割した。A群 (n=12) では、ラットは、移植前1日に開始するシクロスポリンA (CyA) の連日の注入 (サンドイミュン; 10mg/kg、オリーブ油で希釈する、皮下投与; サンド (Sandoz)、イーストハノーヴァー、ニュージャージー州) を受けた。B群 (n=12) ではラットはCyAを投与されなかった。CyA処理ラットは、移植後30日から開始するそれらの飲料水 (250mg/l) を介してテトラサイクリン (パナマイシン; 1日あたりおよそ20~40mg/kg; アップジョン (Upjohn)、カラマズー、ミネソタ州) を投与された。回転の非対称性を移植後4~6週の間隔でモニターし、移植片に関連した機能回復を評価した。A群の1匹のラッ

トが移植手術の間に死亡し、また、B群の1匹のラットがアンフェタミン回転の後に死亡した。

#### ブタ胎児腹側中脳の調製および移植

胎児は、タフツ大学獣医学部 (グラフトン、マサチューセッツ州) の標準的処置に従い、超音波で確認した2匹の授精後27日の妊娠ヨークシャーブタから得た。胎児 (頭から臀部までの長さ、CRL=21mm) を、冷やした無菌のカルシウムおよびマグネシウムを含まないダルベッコ (Dulbecco) のリン酸緩衝液処理生理的食塩水 (PBS) を入れた皿に移し、そして腹側中脳 (VM) を周囲の組織から切開してそしてダルベッコのPBSを含有するペトリ皿に収集した。VM断片を、予め温めたカルシウムおよびマグネシウムを含まないハンク (Hank) の平衡塩溶液 (HBSS) 中の0.05%トリプシン-0.53mMEDTA (シグマ (Sigma)) 1.5ml 中、37℃で10分間インキュベーションした。組織をその後、50 $\mu$ g/mlのプルモザイム (ヒト組み換えデオキシリボヌクレアーゼ、ジェネンテック (Genentech)) を含むHBSSで4度洗浄し、そしてその後、単独の細胞および細胞の小さな塊

を含有する細胞懸濁液が得られるまで、減少する直径の火で磨いた一連のパスツールピペットを通して穏やかに磨碎した。細胞数および生存能力を、先に記述したようにアクリジンオレンジ-臭化エチジウムを使用する蛍光顕微鏡下に決定した。ブランディン(Brundin, P.)ら(1985) Exp. Brain Res. 60:204-208。

ラットは先のセクションに記述されたように麻酔し、そしておよそ200,000個のVM細胞の懸濁液を脱神経した線条体中に移植した。 $10\mu\text{l}$ のハミルトンシリンジを使用し、VM細胞懸濁液 $2\mu\text{l}$ を、 $1\mu\text{l}/\text{分}$ の速度で2個の線条体部位のそれぞれに注入し、その後、針を取り除くのに

先立ち2分間小休止した。(前頂に関しての座標: AP = +1.5、L = -2.8、V = -5.0ないし-4.5; AP = +0.5、L = -3.0、V = -5.0ないし-4.5、切歯バー = -3.3)。全てのラットはセファロチン(ケフリン; 10mg/kg、皮下; リリー・インク(Lilly, Inc.), インディアナポリス、インディアナ州) およびメチルプレドニゾロン(デポーメドロール; 5 mg/kg、筋肉内; アップジョン(Upjohn)、カラマズー、ミネソタ州)の術前用量を受けた。

#### 灌流および組織学的処置

移植後19週に、動物をペントバルビタールナトリウムで終末的に麻酔し、そして250mlの冷ヘパリン化生理的食塩水(1000単位ヘパリン/1 10.9%生理的食塩水)その後250mlの100mM PBS (pH 7.4) 中冷4%パラホルムアルデヒドで左脳室を通し還流した。脳を除去しそしてPBS (pH 7.4) 中30%ショ糖に移す前にこの同じパラホルムアルデヒド溶液中で8時間、後固定した。平衡化の後、一連の $40\mu\text{m}$ の冠状縫合切片を凍結ミクロトームを使用して切断しそしてPBS中に収集した。

6切片ごとに移植片の生存を評価するためにクレシルバイオレットで染色した。ニューロンの生存および移植片の形態学を評価するため、近接の切片を、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、神経フィラメントもしくはドナー由来のグリアについて、アビジン-ビオチンペルオキシダーゼ法(ベクター ラブス(Vector Labs)、バーリングハイム、カリフォルニア州)により免疫染色した。自由に浮遊する切片はPBS中50%メタノールおよび0.3%過酸化水素で20分間前処理し、

PBS中で3度すすぎ、そしてその後、一次抗体との一夜のインキュベーションに先立ちPBS中10%正常ブロッキング血清(NBS; THおよびNF70につい

ては正常ヤギ血清; CD44については正常ウマ血清)で1時間プレインキュベーションした。TH抗体(ペルーフリーズ(Pel-Freez)、ロジャース、アーカンソー州)は1%正常ヤギ血清、1%ウシ血清アルブミンおよび0.1%トリトンX-100を含有するPBSで250倍に希釈した。神経フィラメント分子量70,000に対するモノクローナル抗体(ラットに吸着される、NF70; バイオデザイン(Biodesign)、ケンネブUNKポート、メーン州)はPBSで1000倍に希釈した。ドナーのグリアを免疫染色するために、分化抗原44のブタのクラスターに対するモノクローナル抗体(CD44; ダイアクリン インク(Diacrin Inc.)、チャールズタウン、マサチューセッツ州)をPBSを2000倍に希釈した。切片をその後PBS中で洗浄し、そして、PBS中2%NBSで200倍(TH、CD44)もしくは1000倍(NF70)に希釈したヤギ抗ウサギ(TH; ベクターラプス(Vector Labs))、ヤギ抗マウス(NF70; シグマ(Sigma))もしくはウマ抗マウス(CD44; ベクターラプス(Vector Labs))のビオチン化された二次抗体と90分間インキュベーションした。3度のPBSでのすすぎの後、切片をアビジン-ビオチン複合体(ベクタスタチンABCキットエリート(ELITE)、ベクターラプス(Vector Labs))と90分間インキュベーションし、PBSで1度そして0.05Mトリス緩衝液処理生理的食塩水(TBS)で2度すすぎ、その後TBS中0.04%過酸化水素および0.05%3,3'-ジアミノベンジジン(シグマ(Sigma))で5~15分間発色させた。

選択された切片では、ドナー由来の細胞をジゴキシゲニンで標識したブタ反復エレメント(PRE)DNAプローブでのインジツハイブリダイゼーションを介して同定した。このプローブは脳の切片について以下

の修飾をもち、先に記述されたように(エッティンガー(Oettinger, H.F.)ら(1995) Cell Transplant, 4:253-256)ブタ核と特異的に反応する。簡単には、TH免疫組織化学的染色の後、切片をスライドガラス上に置き、乾燥させ、ペプシ

ンで覆い、そして50℃で15分間インキュベーションした。2×塩化ナトリウム－クエン酸ナトリウム（SSC）中での2度の5分間のすすぎの後、切片を乾燥させ、そして、ハイブリソル（Hybrisol）VIIIで希釈（700倍；オンコー インク（Onco, Inc.）、ゲイタースバーグ、メリーランド州）した234bpのPCR産物をジゴキシゲニンで標識したPREプローブを含有する（25mg/ml）ハイブリダイゼーション混合物で覆った。PREプローブは反復配列に隣接するプライマーを使用するPCRにより創製し、そしてジゴキシゲニンで標識した（ジゴキシゲニンDNAラベルキット、ベーリンガー マンハイム（Boehringer Mannheim）、インジアナポリス、インジアナ州）。切片をガラス製のカバーグラスで覆い、そして100℃で10分間変性させた。37℃での一夜のハイブリダイゼーションの後、スライドガラスを2×SSCに浸してカバーグラスを取り除き、そして切片を2×SSC中65%ホルムアミド溶液中で、37℃で2度そして42℃で1度、10分間ずつすすいだ。切片をその後PBS中で2度すすぎ、そしてアルカリフォスファターゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体（PBS中200倍希釈；ベーリンガー マンハイム（Boehringer Mannheim）、インジアナポリス、インジアナ州）と室温で2時間インキュベーションした。切片をその後5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸／4-ニトロブルー塩化テトラゾリウム（BCIP／NBT）基質（ザイメッド（Zymed）、サンフランシスコ、カリフォルニア州）で発色させ、そしてヌクレアーファストレッドで対

比染色した。

形態計測的および統計学的分析

回転のデータは、SAS 6.08（SAS インスティテュート（SAS Institute）、ケリー、ノースカロライナ州）での分散の反復測定分析（一般的線型モデル）により、その後多重比較のためのコントラスト（CONTRAST）およびボンフェロニ（Bonferonni）の補正により分析した。非線型回帰は、マーカードーレーベンベルク（Marquardt-Levenberg）のアルゴリズムを使用し、デルタグラフプロフェッショナル（DeltaGraph Professional）3.5（デルタポイント（Delta Point）、モンタレー、カリフォルニア州）で実行した。TH陽性のニューロンを各移植片の6切

片ごとに計測し、そしてアベルクロンビー (Abercrombie) の式 (アベルクロンビー (Abercrombie) (1946) Ana. Rec. 94:239-247) を使用して移植片あたりの TH ニューロンの総数として表し、また、移植片の総体積を、コンピュータ画像解析システム (イメージ (Image) v. 1.52、マッキントッシュ用) の助けを借りて CD44 陽性移植片領域を測定しそして移植片を横断する横断面積を積分することにより、定量化した。TH 陽性ニューロンの生存および移植片の体積は、非ペアード t 検定により群間で比較した。  $p < 0.05$  の値は統計学的に有意と考えた。ブタ腹側中脳移植片の回転の非対称性に対する影響

アンフェタミン誘発性の回転の非対称性を、DA を枯渇させたラット線条体へのブタ胎児 VM 細胞の移植の後、4 ~ 6 週の間隔で評価した。CyA 処理および CyA 非処理ラットについての個々の正味の回転スコアは第 14A ~ 14B 図に要約される。CyA 処理群では、8 匹のラットが移植前に関連して移植後 8 週での回転で 50% より大きな減少を示し、

また、9 匹目のラットは 13 週までに回転の低減を示した。13 週に機能性移植片の行動的証拠のあった 2 匹のラットは、移植後 18 週までに移植前の基礎の回転レベル近くに戻った。さらに 2 匹の CyA 処理ラットは、この研究の進行の間に行動の回復のいかなる証拠も示さなかった。

回復の類似の時間経過は、11 匹のラットのうち 6 匹が移植後 8 週に回転の非対称性の 50% より大きな低減を示した非 CyA ラットで明らかであった。さらに 1 匹のラットが移植後 13 週に機能性移植片の影響を示した。しかしながら、本研究の終点では、4 匹の非 CyA ラットのみがこの低減を維持した。この群のラットのうち 4 匹は機能回復の証拠を表さなかった。

群間では移植前の正味の回転スコアに有意の差異は存在しなかった (非ペアード t 検定)。群中で回転行動に対する時間の有意な影響が存在した ( $p = 0.0001$ ) が、それにもかかわらず群と時間の有意の相互作用は存在しなかった。さらに、群の分析は、移植後 8 週に CyA 群および非 CyA 群の双方が、それらそれぞれの移植前の値と比較して回転の対称性に有意の低下を示したことを立証した (CyA : 前 =  $1170.0 \pm 76.9$ 、平均  $\pm$  標準誤差、8 週 =  $483.9 \pm 167.8$ 、 $p = 0.023$ )

；非C y A：前 $=1205.4 \pm 89.5$ 、8週 $=357.0 \pm 138.6$ 、 $p=0.004$ ）。C y A処理群については、回転の欠損のこの弱化は、移植後19週の最終的な回転値（ $465 \pm 178.17$ ）が8週で達成されたそれと有意に異ならずかつ移植前の値より有意に低いままである（ $p=0.01$ ）という知見により指摘されるように、この試験の進行の間維持された。対照的に、非C y A群は移植後8週での回転で有意の減少を示したとはいえ、この矯正は移植後19週で維持されなかった。この時点では正味の回転スコア（ $734.4 \pm 160.1$ ）は8週の回

復点で観察されたそれより有意に大きかった（ $p=0.029$ ）。さらに、この研究の終点では、C y A処理群は移植前の基礎のスコアと有意に異ならなかった。

ブタ腹側中脳移植片の生存および大きさ

神経の異種移植片の生存を移植後19週にT H免疫組織化学およびニッスル染色により評価した。C y A処理ラットの移植片中の生存するT H<sup>+</sup>の細胞集合体の平均数（ $n=6$ ； $3690 \pm 1023$ 、平均 $\pm$ 標準誤差）は、非C y A動物でのそれより有意に大きかった（ $n=6$ ； $257 \pm 164$ ； $p=0.0078$ 、第15A図）。類似の生存効果はドナー特異的なグリアマーカーC D 44について免疫染色した切片の移植片の体積の測定に際し明らかであった（第15B図）。C y A処理群での平均の移植片の体積（ $1.10\text{mm}^3 \pm 0.29$ ）はC y A非処理群のそれより有意に大きかった（ $0.14\text{mm}^3 \pm 0.06$ 、 $p=0.0084$ ）。

T H<sup>+</sup>ニューロンの生存と機能回復の間の相関

正味の回転での変化により測定されるようなT H<sup>+</sup>ニューロンの生存および機能回復の程度 of 非直線回帰分析は、およそ80~100個のT H<sup>+</sup>ニューロンの生存が正味の回転の非対称性での50%低減を達成するのに必要であることを指摘する飽和可能な(saturable)関連（ $y = 10^4 x / [77 + x]$ ； $r^2 = 0.642$ ）を示した（第16図）。およそ850~1000個のT H<sup>+</sup>ニューロンの生存で、行動的回復は回転に対するさらなる影響を提供しない付加的ニューロンの生存でプラトーになった。各群には、行動的回復の証拠を示したにもかかわらず組織学的分析に際して利用可能な組織学的技術を使用して生存する移植片が示されなかった1匹のラットが存在した。これらの動物はこの相関分析には包含しなかった。

## ブタ胎児腹側中脳移植片の形態学および組織化

C y A 処理およびC y A 非処理群での腹側中脳異種移植片のニューロンおよびグリアの組織化をニッスル染色ならびにT H、N F 70およびC D 44免疫染色により評価した。C y A 処理ラットのニッスル染色した切片は、宿主細胞に良好に統合される大きくニューロンの豊富な移植片を示した（第17 A図）。この移植物はS N D A ニューロンの特徴的な形態学をもつ多数のT H<sup>+</sup>細胞集合体を含有了（第17 B図）。ブタV M異種移植片は、移植片の周辺のT H<sup>+</sup>ニューロンの大きなクラスター、ならびに移植物内のかつ移植片から周囲の宿主線条体に神経を分布するように伸長するT H<sup>+</sup>および非ドーパミン作働性のN F 70<sup>+</sup>ニューロン線維の密なネットワークをもつ、S Nの器官典型的な特徴を表した（第17 B～17 C図）。ドナー由来のグリアのC D 44免疫染色は、移植片および移植物から宿主線条体内へ伸長するグリア線維内の明瞭なグリアの区画化を示した（第17 D図）。行動的回復の損失を示した2匹のC y A 処理ラットのニッスル染色は、進行中の免疫拒絶を連想させる移植部位での小さい細胞の浸潤および壊死の制限された領域を示した。加えて、行動的補償を示さなかった2匹のC y A 処理ラットでニューロンの移植片の生存の証拠は存在しなかった。わずかな瘢痕（長さおよそ50～100 $\mu$ m）がこれらの2匹の動物の針の軌跡に沿って存在した。

C y A 処理ラットと対照的に、非C y A ラットからの移植片は特徴として小さく、また、ほとんどない生存するニューロンと凝縮した（第17 E～17 G図）。この群からの全ての生存する移植片は進行中の拒絶過程を示唆する小さい細胞の浸潤の変化する程度を含有した。興味深いことに、C y A 処理ラットで明らかなグリアの区画化は明らかに拒絶を

受けている移植片では欠けており、また、線維の生長は限られた（第17 H図）。しかしながら、非C y A ラットでは、移植片のグリア成分のより大きな生存がニューロン成分に関して明らかであった。有意の宿主組織の損傷は、それらの移植片を明らかに拒絶したラットの移植部位を越えては明らかでなかった。

P R E D N A のインジツハイブリダイゼーションは、移植された線条体の境界内のドナー細胞のみならず、反対側の半球に移動した宿主の白質路内の細胞も

また検出した。移植片由来の線維は線条体の広がり全体に神経を再分布した。TH<sup>+</sup>ニューロンの染色は6-OHDA損傷の同側のSNには存在せず、このことは密な線条体の神経分布はドナー由来であることを指摘した。

今回の結果は、DAを枯渇させたラット線条体内に移植されたED27ブタ神経芽細胞が宿主に神経を再分布し、そしてアンフェタミン誘発性の回転の非対称性により測定されるような機能回復を媒介することが可能であることを立証する。行動的回復の広がり、生存するTH<sup>+</sup>ニューロンの数と高度に相関することが見出された。

機能性移植片の行動的証拠はCyA非処理群に存在し、そして、この群での異種移植片の生存の比較的延長された期間を示唆する。これは、本研究で術前に投与された免疫抑制ステロイドメチルプレドニゾロンの単回用量によるとみられる。ステロイドはいくつかの臨床的な神経移植のプロトコルで使用される（ウィドナー(Widner, H.)ら (1992) ニュー イングランド ジャーナル オブ メディシン(N. Engl. J. Med. 327:1556-1563; リントファル(Lindvall, O.)ら (1994) Ann. Neurol. 35:172-180) とはいえ、神経移植に対するそれらの正確な治療上の利点

は未知のままである。最近の研究は、メチルプレドニゾロンの30mg/kg/日は移植片の生存を高めるが、一方、15mg/kg/日のより低い用量は拒絶される移植片の大多数に帰着することを立証している。かように、この研究で採用されたメチルプレドニゾロンの単回用量が、短期間の移植片の生存および遅延した拒絶に帰着する移植の時点で比較的強力な免疫抑制活性を有した可能性もある。あるいは、コルチコステロイド処理が移植片の生存を低減しうることが報告されている。パティノ(Patino, P.)ら (1992) Soc. Neurosci. Abstr. 18(1-2):59。

にもかかわらず、移植後8週のCyA群および非CyA群の双方でアンフェタミン誘発性の回転の有意の低減が存在したとはいえ、この影響は非CyAラットで持続しなかった。本研究の終点では、非CyA群は移植前の基礎の回転値に戻っていた。反対に、移植後19週では、CyA群での回転は移植前の値よりも有意により低いままであり、かつ移植後8週でみられたスコアと異ならなかった。こ

これらの結果は、C y A の免疫抑制下でブタ移植片が成体の宿主脳中で長期間生存し、かつ、アンフェタミン誘発性の回転試験に際して持続性の機能回復を媒介することが可能であることを立証する。

T H<sup>+</sup>ニューロンの生存および移植片の体積の評価はニューロンの生存に対するC y A の免疫抑制的影響を反映する。C y A 群での移植片は、非C y A 群に比較して有意により大きいT H<sup>+</sup>ニューロンの生存およびより大きな体積を有した。

生存する移植されたT H<sup>+</sup>ニューロンの数と行動的回復の程度との間の相関の高い程度が存在した。回帰分析はアンフェタミン誘発性の回転で最低50%の低減を得るのに必要なおよそ80~100個のニューロンの閾

値の数を示した。線条体のドーパミンの3%の返還のみがアンフェタミン誘発性の回転の回復に必要であることが測定されている (シュミット(Schmidt, R.H.)ら (1982) J. Neurochem. 38:737-748; シュミット(Schmidt, R.H.)ら (1983) Acta. Physiol.Scand. Suppl. 552:19-28)。

C y A 処理群での生存する移植片の組織学的分析は、T H<sup>+</sup>細胞集合体を伴うニューロンの豊富な移植片が主として移植片と宿主の中間面に配置されること、および、移植片内かつ移植された完全な線条体全体に伸長する線維を示した。6-O H D A 損傷に関連するS NでのT H<sup>+</sup>ニューロンの完全な損失はこれらの線維がドナー由来であることを指摘する。同様に、N F 70免疫染色は線維の密なネットワークおよび移植されたブタニューロンの莫大な神経再分布能力を示した。C D 44免疫染色は、白質路内のグリアの組織化および宿主内への線維の伸長を立証した。対照的に、C y A 非処理ラットでの移植片の大多数は小さく、かつ、ニューロンのまばらな分布を含有した。ブタ特異的D N A マーカーを使用して、ドナー由来の細胞の相対的広がり、周囲の線条体および反対側の半球への細胞の若干の移動を伴い、移植片全体で密であることが示された。実施例V：損傷を生じさせたラット脳へのブタ腹面中脳及びブタ線条体細胞の移植、並びに移植された細胞軸索標的特異性の組織学的例証

移植用細胞懸濁液及び細胞培養物の調製

線条体組織培養のために、ブタ胚 (E 3 5) からの側方神経節丘 (L G E) (P a k z a b a n、P. 等、(1993) E x p. B r a i n R e s. 97: 13-22) を解離し、または黒質培養のために、腹面中脳 (E 2 5) を解離し、そして、これらをフェノールレッドを欠いているカルシウム及びマグネシウムフリーのハンクス平衡塩溶液 (H B

S S ; S i g m a) を含んでいるペトリ皿へ移した。線条体及び黒質培養用の細胞懸濁液の調製のために、L G E 及び V M 組織断片をそれぞれ各ブタ同腹子からプールした。これらの組織断片を、H B S S (S i g m a) 中 1 m l の 0.5% トリプシン-0.53 m M E D T A で 37℃ で 10 分間インキュベートした。これらの断片を新しい H B S S で 4 回洗浄し、次に、目に見える組織断片がない乳状の細胞懸濁液が得られるまで、段階的により小さい内径の火仕上げしたパスツールピペットの先を通して穏やかに研和した。細胞数及び生存度をアクリジンオレンジ-臭化エチジウム法により測定した。

線条体培養物の調製のために、N e u r o - C 培地中ポリ-D-リジン ( $100 \mu g m l^{-1}$ ) で 30 分間処理したカバーガラス上で解離した細胞を培養した。N e u r o - C 培地 (C o o n、H. G. 等 ((1989) P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A 86: 1703-1707 により開発された培地の修正) を、基礎培地として K a i g h n' s 修正 H a m' s F 12 と、以下の加えられた補充物、すなわち、 $15 \mu g m l^{-1}$  アスコルビン酸、0.25% 仔ウシ血清、 $6.25 \mu g m l^{-1}$  インシュリン、 $6.25 \mu g m l^{-1}$  トランスフェリン、 $6.25 \mu g m l^{-1}$  亜セレン酸、 $1.25 m g m l^{-1}$  ウシ血清アルブミン (B S A)、 $5.35 \mu g m l^{-1}$  リノール酸、 $30 p g m l^{-1}$  チロキシン (T 3)、 $3.7 n g m l^{-1}$  ヒドロコルチゾン、 $10 n g m l^{-1}$  ソマトスタチン、 $10 n g m l^{-1}$  G l y - H i s - L y s (肝細胞成長因子)、 $0.1 \mu g m l^{-1}$  上皮成長因子 (E G F)、 $50 \mu g m l^{-1}$  ウシ下垂体抽出物 (B P E) とで調整した。B P E は、N e i f f e n e g g e r (W o o d l a n d、C a l i f o r n i a) から購

入した冷凍ウシ下垂体で公開された方法に従って調製し、全ての他の培地添加物は、Sigma Chemical Co. から購入した。

免疫組織化学または免疫蛍光のために処理する前に、細胞を数週間培養した。染色のために、細胞をカルシウム及びマグネシウムフリーのDulbecco's PBS (D-PBS) 中4%のパラホルムアルデヒド中に37℃で15分間固定させた。広い種を認識するCD-44抗体クローンBAT31AはVMRD、Inc. (Pullman, Washington) から購入し、CD44に対するモノクローナルブタ特異的抗体も用いた (クローン10-14、Diacrin, Inc.、Charlestown, Massachusetts)。ウサギ抗-GFAPをSigmaから購入した。モノクローナル抗-ガラクトセレブロシド抗体 (GalC) をBoehringer Mannheimから購入した。ウシ70-kDニューロフィラメント (NF70) に対するモノクローナル抗体をBiodesign (Kennebunkport, Maine) から購入した。フルオレセインを結合したヤギ抗-ウサギ及びロダミンを結合したヤギ抗-マウス抗体をCappel (Durham, North Carolina) から購入し、Vectastain Elite ABCペルオキシダーゼキット (Vector Laboratories, Burlingame, California) を免疫組織化学染色のために用いた。

#### インビボ移植実験の考案及び治療群

黒質ドーパミンニューロンの事前の選択的な一側性の損傷を有するラットにおいて線条体のドーパミン作動性の神経分布をインビボで再構成するために、側方神経節丘のために記述したもの (上記) と同じ条件を用

いて、ブタ腹面中脳 (E25) を細胞懸濁液に解離した。神経膠及び軸索成長への無傷のまたは損傷を生じた領域中の異所的及び同所的配置の影響を評価するために、ラットホストの線条体 (n=21) または中脳 (n=9) 部位のいずれかに胚の腹面中脳細胞を移植した。

胎児の線条体神経細胞との線条神経回路再構成のインビボモデルのために、300-350gの重量の成長したオスのSprague-Dawleyラット (

Charles River Laboratories) に、移植の一週間前に右の新線条体へのキノリン酸の片側だけのの定位固定注射を与えた。Pakzaban、P. 等、(1993) Exp. Brain Res. 97:13-22。損傷を生じたラット ( $n=50$ ) に、ブタ胎児終脳に関して以前記述された (Pakzaban、P. 等 (1993) Exp. Brain Res. 97:13-22; Deacon、T. W. 等 (1994) Brain Res. 668:211-219) ように LGE から調製した線条体細胞懸濁液 (細胞濃度、マイクロリットル当たり  $50-75 \times 10^3$  細胞) を、線条体に片側だけに移植した。一回の手術において、幾匹かのブタ同腹子 (E35) 由来の LGE 細胞懸濁液をラット宿主線条体に移植した ( $2-3 \mu l$ ; 全ての動物において  $150 \times 10^3$  の総細胞量)。

#### 免疫抑制

80匹の移植されたラットは、手術前にシクロスポリン A (CsA,  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ; Lilly Inc. Indianapolis, Indiana) の毎日の皮下注射により全身的な免疫抑制を受け、そして、テトラサイクリン (パナマイシン、 $20-40 \text{ mg kg}^{-1}$ ; Sandoz Pharmaceuticals, East Hanov

er, New Jersey) を与えられた。手術前に、全ての動物を単一の皮下服用量の抗生物質のセファロチン (ケフリン、 $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ; Lilly

Inc.、Indianapolis, Indiana) で処理し、その後、これらの飲み水 ( $250 \text{ mg l}^{-1}$ ) 中にテトラサイクリン (パナマイシン、一日当たり  $20-40 \text{ mg kg}^{-1}$ 、Upjohn, Kalamazoo, Michigan) を与えた。CsA の適当な血清レベルを確かめるために、(灌流時に得られた) CsA 処理した動物からの心臓内血液を、ラジオイムノアッセイ (Damon Laboratories, Westwood, Massachusetts) による CsA レベルの測定のために供した。異種移植組織及び宿主脳の形態学的分析のために、移植後1ないし15カ月に、全ての動物を4%パラホルムアルデヒドで灌流した。

### 神経移植組織の免疫組織化学及び顕微鏡検査

免疫染色のために、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法 (Vector Laboratories) を用いた。浮動性切片をPBS中50%のメタノール及び3%の過酸化水素で20分間前処理し、PBS中で3回すすぎ、PBS中10%の正常ウマ血清 (NHS) 中で60分間インキュベートし、その後、第一抗体と共に動いている台の上で一晩インキュベートした。この研究に用いた第一抗体及びインキュベーションバッファーは、PBS中に1:2,000で希釈されたブタCD44 (クローン10-14) を検出するためのモノクローナル抗体、PBS中1%のBSA、1%のNHS、及び0.1%のTriton X-100に1:40で希釈された70-kDニューロフィラメント (NF70) を検出するためのモノクローナル抗体、1:250に希釈されたチ

ロシンヒドロキシラーゼ (TH、Pel-Freez、Rogers、Arkansas) ???からなった。PBS中10分のすすぎ及び5%NHS中10分の2回の洗浄後、PBS中2%のNHS中1:200に希釈した適当なビオチン化第二抗体 (ラット吸着した、Vector Laboratories) に切片を室温で60-90分間インキュベートした。次に、これらの切片をPBS中で3回洗浄し、PBS中アビジン-ビオチン複合体 (Vectastain ABC Kit ELITE、Vector Laboratories) に室温で60-90分間インキュベートした。PBS及びトリス緩衝食塩水で十分にすすいだ後、トリス緩衝食塩水中0.04%の過酸化水素及び0.05%の3,3'-ジアミノベンジジン (DAB、Sigma) 中で切片を染色した。

染色の特異性を確かめるために、第一抗体を省略したコントロールを選択した切片に行った。CD44及びNF70抗体はブタ組織に結合したが、ラット組織には結合せず、ブタからラットへの移植におけるドナー特異的マーカーとして用いた。以前記述された (Pakzaban、p. 等、(1993) Exp. Brain Res. 97:13-22; Asher、R. 等 (1992) Exp. Cell Res. 203:80-90; Girgrah、N. 等、(1991) J. Neuropath. exp. Neurol. 50:779-792) よ

うに、CD44及びNF70を、それぞれドナーの神経膠及びニューロンのマーカーとして用いた。顕微鏡 (Zeiss Axioplan)、カメラ (Panasonic WV-CD)、及び画像システム (Adobe Photoshop 2.5ソフトウェア及びMacintoshシ

ステム)を用いて、移植された胚ブタ細胞の存在に関して、全ての切片を評価した。調整した画像分析ウィンドー上の移植組織の境界を定め、続いて解剖学的マッピングを行うことにより、種特異的マーカーを用いて、移植組織の配置を決定した。暗視野顕微鏡法を用いて、ニューロン及び神経膠繊維を追跡し、位置を定めた。神経膠繊維及び軸索の二重標識のために、まず、Vector VIP基質キット (#SK4600)と処理される抗-CD44抗体と切片をインキュベートし、紫色の反応生成物を生じる。同じ切片を抗-NF70と再インキュベートした後、DAB基質と共に標準Vectastatin (Kit ELITE、Vector Laboratories)との処理を続け、褐色の反応生成物を生じた。顕微鏡下で、これらの2つの反応生成物を色により明らかに識別できる。

#### 移植されたブタ神経膠及び軸索繊維の成長

ラット線条体に移植されたブタLGEからの神経芽細胞を用いた一連の異種移植実験において、異なる時点 (1-15カ月)で細胞成熟及び繊維成長を分析した。移植後1カ月で、NF70<sup>+</sup>軸索及びCD44<sup>+</sup>神経膠繊維が宿主組織中に伸びていた。2ないし4カ月までに、広範囲に及ぶCD44<sup>+</sup>神経膠繊維の成長が、全てのホストの移植組織近くの白質領域 (tract)において観察され、そして、NF70<sup>+</sup>の成長もまた、幾匹かのホストの移植片近くの白質及び灰白質組織において観察されたが、軸索は神経膠繊維ほど広範囲ではなく、またこれらの領域内でそれほど遠くまでは伸びなかった。6カ月までに、そして全ての後の時点で、CD44<sup>+</sup>星状神経膠細胞体が移植片近くの大部分の白質領域 (tract)において観察され、そしてCD44<sup>+</sup>繊維は移植片か

ら8mmまでに観察された。この段階で、NF70<sup>+</sup>軸索もまた、移植細胞型に

適合したホストの白質領域 (t r a c t) 及び灰白質標的組織において観察される。後の時点は、連続した軸索成長を示さない。この時間経過にわたって、細胞構造及び免疫組織化学染色もまた、ブタ線条体 (またはVM) の正常な成熟に典型的である成熟変化を反映して変化した。要約すると、C D 4 4<sup>+</sup>神経膠繊維は白質への豊富な非特異的成長を示し、一方、軸索の成長はより特異的で灰白質へも侵入する。移植組織の成長は新しいドナーの移植片におけるよりもより延長されるが、ブタの成熟にとって例外的ではない。

神経回路再構成における神経移植組織の神経膠及び軸索成長パターンを測定するために、黒質緻密部領域の一側性損傷により生じたドーパミン細胞及び軸索の枯渇を示すパーキンソン病の動物モデルを用いた。A g u a y o、A. J. 等 (1984) N e u r o s c i. L e t t. 45:53-58; B r u n d i n、P. 等 (1985) B r a i n R e s. 331:251-259。移植後1ないし6カ月で、死後の分析において、ブタVM (胚の25日 (E25)) 由来のドナーの胚細胞は、免疫抑制下でホストの成体ラット線条体内に伸びるのが見られた。VM移植片からのC D 4 4<sup>+</sup>神経膠細胞からの繊維性突起は、ホストの線条体の有髄繊維束に侵入しているのが見られた。そのようなC D 4 4<sup>+</sup>神経膠細胞及び繊維はいつも内包の有髄繊維束中へ伸び、そこから、数ミリメートルまでの繊維長で多数のホストの繊維神経索 (t r a c t s) にも達した。VM移植片のN F 7 0 染色を用いて、線条体外部に位置するホストの標的領域への非ドーパミン作動性細胞の突起を調べた。軸索が非常に多量に成体ホストの内包の有髄繊維神経索 (t r a c t s) 内

部に伸びているのが見られた。胎児VM移植組織からのこれらの非ドーパミン作動性軸索のいくつかは、腹面前部及び中背面の視床の灰白質に選択的に突起していた。これらの領域には、通常、そのようなVM領域において黒質網状組織部及び深中脳核としてそれぞれ位置するニューロンが発達している。視床に達するこれらのN F 7 0<sup>+</sup>ブタ軸索により用いられる経路は、内包のような有髄神経索 (t r a c t s) に限定された。

VM由来の移植片は、チロシンヒドロキシラーゼ (T H<sup>+</sup>) に対する免疫組織

化学染色により確認されたように、低い割合（約5-10%）のドーパミン作動性であるニューロンを含んだ。VM移植片のニューロンコアから、TH<sup>+</sup>軸索がホストの内包有髄繊維束間の線条体灰白質に直接数ミリメートル分岐した。TH<sup>+</sup>軸索はこの灰白質標的領域に豊富に分岐したが、稀にしか白質領域に侵入またはこれを越えなかった。ラット中脳に置かれた移植組織からのドーパミン作動性の軸索（異所的、背面、または同所的のいずれかの腹面nigral配置）は、ドーパミン作動性の繊維が次にホストの灰白質中へ広範囲に分岐する線条体への途中の有髄繊維束の内部に見られた。中脳に置かれたVM移植組織の場合におけるように、神経膠繊維もホストの白質有髄繊維束内部に伸びているはっきり識別できる繊維束または分岐した形態として見られたが、ドナーの軸索と異なり、これらはいかなる灰白質領域にも侵入しなかった。

#### ドナーの軸索及び神経膠繊維の二重標識

ドナーの神経膠及びドナーの軸索の形態を明白に確認するために、特異的な抗体での二重標識を個々の脳切片に行った。二重標識は、神経膠繊維及び軸索の形態が、同じ白質領域（tract）において近接して

伸びている時でさえ、非常に異なることを示した。NF70<sup>+</sup>軸索は、二重標識（褐色対紫色）及び異なる形態により、いつもCD44<sup>+</sup>繊維から区別できた。神経膠繊維は非特異的にホストの白質中へ伸びたが、ホストの灰白質には伸びなかった。

CD44<sup>+</sup>神経膠繊維はいつも、特有の厚みのある不揃いな表面の非常に分岐した突起を有した。これに反して、NF70<sup>+</sup>軸索はいつも、CD44<sup>+</sup>繊維から離れそしてホストの有髄神経索（tracts）と平行して伸びている小内径の突起を有し、白質内で分岐しなかった。灰白質においては、NF70<sup>+</sup>軸索のみが見られた。そのような軸索は、時々分岐した。要約すると、ドナーの軸索のみが、遠い灰白質標的中へ侵入するのが見られ、一方、CD44<sup>+</sup>神経膠繊維は、移植部位から広がる全ての白質領域（tract）において見られ、移植組織自身より外部のホストの灰白質においては決して見られなかった。

#### 灰白質ホスト標的領域への特異的な軸索の侵入

ホストの異なる脳領域における神経膠繊維及び軸索の成長の体系的な比較は、これらの異なる向性特徴を示す。例えば、4カ月のLGE移植片からの軸索は、有髄内包繊維束内部に伸び、そこでいくつかの軸索は、ホストの淡蒼球に直接向かっているのが見られた。これらのNF70<sup>+</sup>繊維は、線条体のこの正常灰白質標的領域内部で広範囲に樹枝状になっていた。これに比べて、CD44<sup>+</sup>神経膠繊維は、この灰白質標的領域内へ伸びなかった。その代わりに、神経膠繊維は、尾部方向に突出している内包の有髄繊維神経索 (tract) 内とどまる。entopenduncular核及び腹面淡蒼球領域 (中扁桃核の近くの) において、同じパターンが観察された。NF70<sup>+</sup>軸索繊維が、CD44<sup>+</sup>神経膠繊維

に沿って内包中に伸びているのが見られた。しかしながら、NF70<sup>+</sup>軸索のみが、ラットエントペンダンクラー (entopenduncular) 核に侵入及び分岐し、そして扁桃核の灰白質中へ進んでいるのが見られ、一方、神経膠突起は、同じ切片面における白質領域 (tract) に限定される。黒質の離れた線条体標的部位で、ドナーの神経膠突起と異なる灰白質への誘導された標的的特異的軸索成長も見られた。線条体のドナー軸索は、黒質網状組織部の灰白質領域中へ侵入した。CD44<sup>+</sup>神経膠繊維もNF70<sup>+</sup>繊維に沿って皮質脊髄路に伸びたけれども、これらはこの中脳灰白質線条体標的領域中へ伸びなかった。

実施例VI：損傷を生じたラット脳へのラット及びブタ皮質細胞の移植並びに移植された細胞の組織学的検査

#### 実験動物

実験の開始時に200-250gの重量の32匹のメスのSprague Dawleyラット (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) をこの研究に用いた。12時間の明暗周期の下で、コロニー室においてかご当たり2ないし3匹の群で収容した。これらの動物を以下の3群、すなわち、刺激毒性の皮質損傷を有する12匹のラット、損傷に加えて胎児ラット移植片を有する11匹のラット、及び損傷に加えて胎児ブタ移植片を有する9匹のラットに分けた。

#### 移植用細胞懸濁液の調製

一定期間のペントバルビタール麻酔の下で、定期に交尾させた妊娠している *Springe-Dawley* ラットから、(頭殿長 (CRL) 12-14 mm、13-14 日の妊娠期間と概算される; *Charles*

*River Laboratories* により供給された) 14 匹のラット胎児を取り除いた。滅菌したリン酸緩衝食塩水 (PBS) 中 40 倍の倍率で、各胎児から皮質神経組織を両側に解離した。Turfts School of Veterinary Medicine (Grafton, MA) での標準的な獣医学の方法に従った安楽死の後、定期に交尾させた妊娠している *Yorkshire* ブタから (CRL 37 mm、38-39 日の妊娠期間と概算される) 8 匹のブタ胎児を取り除いた。無菌研究室施設 (*Diacrin, Inc.*、*Charlestown*, MA) へ子宮ホーン (horns) を氷上で運んだ。次に、子宮袋を開き、胎児を滅菌した PBS へ移した。これらの胎児の脳を次に取り除き、大脳辺縁皮質ではなく予定運命の運動/体性感覚皮質だけを取り除くように気をつけながら、皮質原基を解離した。

ラット及びブタ組織を、滅菌したハンクス平衡塩溶液 (HBSS; *Sigma Chemical CO.*、*St. Louis*, MO) 中に別々に集めた。ラットの組織を 0.1% トリプシン中 37℃ で 20 分間インキュベートした。ブタの組織を 0.5% トリプシン及び DNase (80 Kunitz units/ml) 中 37℃ で 30 分間インキュベートした。次に、両組織を HBSS で 3 回洗浄し、均質の懸濁液が得られるまで、火仕上げしたパスツールピペットで注意深く研和した。アクリジンオレンジ/臭化エチジウム排除法 (*Brundin, P.* 等 (1985) *Brain Res.* 331:251-259) により測定された、ラット細胞の生存度及び濃度は、それぞれ 97% 及び 30,000 細胞/ $\mu$ l であり、そしてブタ細胞の生存度及び濃度は、それぞれ 96% 及び 18,000 細胞/ $\mu$ l であった。

#### 損傷及び移植手術

全ての 32 匹のラットを右背側皮質のキノリン酸損傷に供した。ケフリン (1

0 mg/kg) 及びアトロピン (0.1 mg/kg) の前処理後、ペントバルビタール麻酔 (65 mg/kg) の下で、各ラットをKopflラット定位固定フレーム (IB: -3.3) 上に載せ、頭皮及び骨膜を通して正中線切開を行った。両耳間ゼロからAP + 0.5、L - 2.4と測定された位置で、穿頭穴をあけた。この穿頭穴を通して、水平面から10°の角度で吻部方向に注入をおこなった。5 µlのHamilton注入器を用いて、皮質に(硬膜から測定して)10 mm水平に侵入させ、計5 µlのリン酸緩衝食塩水、pH 7.4 (PBS) 中100 mMのキノリン酸溶液 (500 nmol/L) (Schwartz, R. 等 (1983) Science 219: 316-319) を注入した。これらの注入物は、針路に沿って2 mm離れた間隔の5つの異なる部位間で等しく分配された (図18A参照)。各部位で2分にわたって1 µlのキノリン酸塩を注入し、続いて1分中断した。針を引き抜いた後、収縮した皮膚の端を注意深くつつけ縫合した。

図18A-18Cは、皮質の損傷及び移植部位、並びに損傷及び移植片の特徴的な細胞構造を示す。図18Aは、Paxinos及びWatson ((1986) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego. Academic Press) の図表集から描き直した切片上の損傷及び移植片の定位固定位置及び経路の概要図を表す。注入部位を示す小さい丸い点と共に、針路の位置を線で示す。図18Bは、軟膜表面のspring、下にある線条体の容積の減少、及び脳室拡大を示している、典

型的な皮質損傷を受けた冠状切片を示す (損傷後8カ月)。図18Cは、損傷場所の完全な充填及び移植片内の細胞の密集した組織化を示している、典型的な皮質移植を受けた冠状切片を示す (損傷及び移植後8カ月)。図18B及び18Cは同じ縮尺まで拡大され、図18Cにおける縮尺線は500 µmを示す。

刺激性毒素を運ぶために用いたのと同じ斜め定位固定の方法を移植手術のために用いた。損傷手術後3日目に、11匹のラットに、損傷を生じた経路に沿って3.5 µlの胎児ラット皮質懸濁液 (約100,000細胞) を与えた。損傷後

4日目に、9匹のラットに同じように $4\mu\text{l}$ の胎児ブタ移植片（約90,000細胞）を与えた。これらの9匹のラットを、移植前日に始まり実験の期間中、シクロスポリンA（CsA： $10\text{mg/kg}$  s.c.；Sandoz Pharmaceuticals、East Hanover、NJ）の毎日の注入により免疫抑制した。

#### 灌流及び組織処理方法

同種移植及び異種移植群の生存期間は、それぞれ31及び34週であった。損傷のみの群のうち7匹を31週目で殺し、そして5匹を34週目で殺した。深いペントバルビタール麻酔の下で、 $250\text{ml}$ の冷ヘパリン添加食塩水（0.9%食塩水中0.1%のヘパリン）で次いで $200\text{ml}$ のPBS中4%のパラホルムアルデヒド（PFA）により、各動物に心臓内灌流を行った。全ての動物から脳を取り除き、PBS中4%のPFAに $4^{\circ}\text{C}$ 中で一晩後固定した後、これらをPBS中30%のショ糖中における平衡化により不凍にした。次に、凍結しているミクロトーム上で $40\mu\text{m}$ の厚さで冠状または矢状のいずれかに脳を切断し、切片を

6連続でPBS中に連続して置いた。

#### ニッスル染色及びアセチルコリンエステラーゼ組織化学

一般的な形態分析のために、各脳からの一組（6番目の切片ごと）を酢酸塩—アルコール法によりクレシルバイオレットで染色した（ニッスル染色）。

移植片内、並びに移植片及びホストの皮質間の繊維の融合の程度を分析するために、Gensler-Jensen、F. A. 及びBlackstad、T. W.（1971）Z. Zellforsch 114：460—481の方法により、各脳からの一組にアセチルコリンエステラーゼ（AChE）組織化学を行った。簡潔に言えば、切片をスライドグラスに載せ、乾燥させ、次に $30\text{mM}$ 酢酸ナトリウムバッファー、 $\text{pH } 5.0$ 、 $0.1\text{mM}$ エトプロパジン、 $4\text{mM}$ ヨウ化アセチルチオコリン、 $16\text{mM}$ グリシン、及び $9\text{mM}$ 硫酸銅を含んでいるインキュベーション溶液中で6時間インキュベートした。これらのスライドグラスを次に蒸留水ですすぎ、10%フェリシアン化カリウム中で90秒間染色し、再び

蒸留水中で洗浄し、0.5%硫化ナトリウムに30-40秒間さらした。

#### 免疫組織化学

移植片への求心性神経分布を分析するために、移植された脳からの6番目ごとの切片を、それぞれ黒質及び青斑からのドーパミン作動性及びノルアドレナリン作動性の繊維のマーカーであるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) に対して免疫染色した。加えて、ブタ移植片からラットホストへの軸索及び神経膠繊維の伸長を調べるために、ブタ脳においては発現されるがラット脳では発現されないタンパク質に対する抗体で、こ

れらの脳を免疫染色した。これらのドナー特異的なタンパク質は、分化抗原 (CD44) のブタ群、ブタ星状細胞の神経膠繊維上に見られる膜タンパク質、及びブタ軸索のマーカーであるウシニューロフィラメント (NF70) である。

アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法 (Vectastain ABC Kit ELITE; Vector Labs, Burlingame, CA) を用いて、免疫組織化学を行った。浮動性の切片をPBS中50%のメタノール及び3%の過酸化水素で20分間前処理し、PBS中で3回すすぎ、そしてPBS中10%の正常ブロッキング血清 (NBS; CD44及びNF70染色には正常ウマ血清を用い、TH染色には正常ヤギ血清を用いた。) 中で60分間インキュベートし、その後、動いている台の上で第一抗体と共に一晩インキュベートした。この研究に用いた第一抗体及びインキュベーションバッファーは、PBS中に1:2000に希釈されたブタCD44 (クローン10-14; Diacrin, Charlestown, MA) に対してマウス中で作られたモノクローナル抗体、PBS中1%のウシ血清アルブミン、1%のNBS、及び0.1%のTriton X-100中に1:40に希釈されたNF70 (Biodesign, Kennebunkport, ME) を検出するためにマウス中で作られたモノクローナル抗体、及びPBS中2%のウシ血清アルブミン、1%のNBS、及び0.1%のTriton X-100中に1:500に希釈されたTH (Pel-Freez Biologicals, Rogers, AK) を検出するためにウサギ中で作られたポリクローナル抗体からなる。PBS中で10分す

すぎ、5% NBS中で10分間2回洗浄した後、2% NBS中

に1:200に希釈した(CD44及びNF70に対して染色した切片に対しては)ビオチン化したウマ抗マウス抗体または(THに対して染色した切片に対しては)ビオチン化したヤギ抗ウサギ抗体中で切片を室温で60分間インキュベートした。次に、これらの切片をPBS中で3回洗浄し、PBS中のアビジン-ビオチン複合体中に室温で90分間インキュベートした。PBS及びトリス緩衝食塩水(TBS)中で十分にすすいだ後、切片をTBS中0.04%の過酸化水素及び0.05%の3,3'-ジアミノベンジジン(DAB; Sigma, St. Louis, MO)中で染色した。

#### トレーサーの注入

同種移植片からの繊維の成長を調べるために、皮質同種移植片により潜在的に神経を分布されることのできた皮質下領域に蛍光退行性色素を注入した。特に、殺す7日前に、同種移植プロトコルの動物(n=11)を麻酔にかけ、Fast Blue (3%溶液; Sigma, St. Louis, MO)及びFluoro-Gold (2.5%溶液; Fluorochrome, Englewood, CA)の0.5  $\mu$ l注入物を、移植された皮質と同じ側の線条体及び大脳脳脚にそれぞれ与えた。同じ側の皮質への色素の漏れによる誤った標識を避けるために、注入は、反対側の大脳半球を通り標的部位へ斜めに行った。注入位置及び角度は以下の通りである。線条体へのFast Blueの注入は、垂直面から65°の角度でブレグマからL: +5.0 mm、AP: 0、V: -9.0 mmと計算された位置で行った。大脳脳脚へのFluoro-Goldの注入は、垂直面から30°の角度でブレグマからL: +3.0 mm、AP: -6.0 mm、V: -9.5 mmと測定された位置で行った。

#### 皮質損傷の形態学的分析

皮質損傷のみを有する場合の調査は、背側皮質(前頭部及び感覚運動皮質を含む領域)中の尾-吻側の円柱状の腔においてニューロンが失われ、一方、硬膜及びその下にある脳梁は大部分無傷のままであることを明らかにした(図18B

参照)。多くの場合において、損傷と同じ側の線条体の収縮及び腔の拡大もまた明白であった。これは、脳梁を通してのキノリン酸の漏れ、及び／または損傷を生じた皮質中の線条体突出領域の破壊により生じた続いて起こる線条体における退行性の退化により引き起こされたのかもしれない。

#### 同種移植片の組織学的分析

このプロトコルの11匹の動物全ては、ホスト組織に対してはっきりと区別される残存している移植片を有するのが見られた。3つの場合のほか全てにおいて、これらの移植片は正常な皮質とほぼ等しい程度に全損傷腔を充填した（図19C参照）。

図19A-19Dは、ラット皮質同種移植における移植片-ホスト境界での細胞構造、並びに移植片及びホストの接続性を示す（各場合において、移植片は矢印の左側である）。図19Aは、移植片内の細胞の乏しい境界及び細胞の非薄層状配置を示している、細胞体のニッスル染色を示す。図19Bは、移植片へのAChE陽性繊維の広範囲に及ぶ侵入を示している、アセチルコリンエステラーゼ組織化学染色を示す。図19Cは、移植片及びホストにおける求心性繊維の類似した密度を示している、繊維のチロシンヒドロキシラーゼ免疫組織化学染色を示す。図19Dは、同じ側の線条体及び大脳脚への蛍光退行性トレーサー色素の沈着後の、移植片の近くではあるが移植片内ではないホスト皮質中の錐

体細胞の細胞体の退行性標識を示す。図19A-19Cは、同じ縮尺に拡大され、Aにおける縮尺線は250  $\mu\text{m}$ を示す。図19Dはより高い倍率に拡大され、その縮尺線は50  $\mu\text{m}$ を示す。

3つの場合において、移植片はホストの皮質より厚く、その下にある脳梁及び線条体にとって代わった。ニッスル染色した切片は、正常な皮質に特徴的な薄層状組織がこれらの移植片内にはないことを明らかにした。その代わりに、移植片の形態は、大部分が白質からなる領域によりお互いから分離されたニューロンが豊富な領域により特徴づけられる（図18C及び19A参照）。これらの集団は、移植片の全体にわたって散在した小さな介在ニューロンと共に、大きい錐体様ニューロンからなった。

AChE 繊維密度は、周囲にあるホストの皮質におけるより移植片においてわずかに低く、また正常な薄層状パターンを欠いた。しかしながら、多数のAChE 陽性繊維が移植片内に観察され、ホストの皮質と連続的な網状組織を形成した（図19B参照）。無傷の反対側の皮質において見られるもの匹敵する、多数のTH陽性の繊維が移植片中に見られた。広範囲に及ぶ標識が隣接したホストの皮質において見られたけれども、線条体に注入されたFast Blue及び大脳脚に注入されたFluoro-Goldからのニューロンの蛍光逆行性標識は、同種移植片内に存在しなかった。

#### 異種移植片の組織学的分析

異種移植プロトコルの9匹の動物のうち5匹が、残存している移植片を有するのが見られた。これらの5匹のうち2匹は、損傷腔を完全に充填した移植片を有した。肉眼では、これらの外観は同種移植片に非常に

類似していた。移植組織はホスト組織からはっきりと区別され、またニューロンの集団も示した。AChE及びTH繊維の分布も、残存しているブタ移植片において同種移植群のものに非常に類似していた。

しかしながら、ドナーの遠心性成長に関して、同種及び異種移植片間で著しい違いがあった。図20A-20Fは、ブタ皮質異種移植片からの軸索及び神経膠繊維の成長を示す。図20Aは、（矢じりで囲んだ）移植片の位置及び細胞構造を示しているニッスル染色したラットホスト脳のパラサジタルビュー（parasagittal view）、並びに70kDニューロフィラメント（NF70）を用いてブタ軸索に対して（図20B-20D）及びCD44表面抗原に対する抗体を用いてブタ星状神経膠繊維に対して（図20E-20F）特異的に免疫反応させた選択された領域を示す代表的な写真（図20B）のおおよその解剖組織の位置を示す。図20Bは、移植部位の下脳梁（cc）に侵入しているNF70陽性のブタ移植片軸索（矢印）を示す。図20Cは、移植片と同じ側のホスト線条体の灰白質中のNF70陽性の移植片軸索（矢印）を示す。図20Dは、脳梁の膝状湾曲構造の周りを通った後、中前脳束内の尾-腹面方向に伸びているNF70陽性のブタ移植片軸索（矢印）を示す。図20Eは、黒質のレベルで

同じ側の大脳脳脚内に伸びているCD44陽性のブタ星状神経膠繊維を示す。移植片の軸索は、このレベルで見られなかった。図20Fは、淡蒼球のレベルで内包内でCD44陽性の星状神経膠繊維を示す。画像は同じ縮尺ではない。図20B、20D、及び20Fにおける縮尺線は、 $50\mu\text{m}$ を示す。図20C及び20Eの縮尺線は $100\mu\text{m}$ を示す。

NF-70免疫反応性に基づく、移植片はドナー由来の軸索で密に

充填されていた（図20A参照）。かなり多数の軸索が、移植片から5mmまでホストの背面線条体に神経分布するために無傷の脳梁を横切っている（図20B）が、大部分の軸索は背面脳梁に沿ったわずかに接する経路をとり、白質へ入る代わりに皮質組織へ突起した。比較的少数の軸索が内包繊維束に入り、線条体より尾側には何も見られなかった（図20C）。これらの短距離の突起の一つの大きい例外は、基底前脳の中前脳束への帯状束を通ったかなり大きい突起であった（図20D）。これらの軸索は、少なくとも10mmであると概算される脳梁の膝状湾曲構造の周りの遠回りの経路をたどった。コロサル（collateral）突起によるホストの皮質及び反対側の大脳半球へのドナーの軸索成長は、同種移植実験において以前観察された（Isacson, O. 及び Sofroniew, M. V. (1992) Exp. Neurol. 117:151-175）よりもより広範囲であった。

図21A-21Bは、皮質移植片からラットホストの同じ側の大脳皮質（図21A）及び反対側の脳梁（図21B）へ突起しているNF70陽性のブタ移植片軸索のパラサジタル（parasagittal）切片を示す。特に、図21Aは、皮質移植片から移植片（この移植片は、図の左端をちょうど越えた所に位置する）の後ろのホストの大脳皮質への非常に長い距離のブタ軸索突起を示す。縮尺線は $250\mu\text{m}$ を示す。図21Bは、移植片と反対側の脳梁中の反対側の皮質に向かって突起している移植片軸索（垂直に向いた小さい白い繊維）を示す。この脳梁は、左（吻側）から右（尾側）に向いた明るいバンドとして見る事ができる。縮尺線は $100\mu\text{m}$ を示す。

種特異的ブタ細胞表面星状神経膠マーカー（CD-44）を用いて、

ホスト脳における長距離の繊維様伸長も観察された。そのようなドナー由来の神経膠突起は、多くの前脳ホスト白質領域 (t r a c t s) において存在していた。これらは、脳梁、大脳脳脚、内包、及び帯状束を含んだ。ドナーの神経膠細胞及びこれらの突起が、線条体及び視床のレベルで内包のようなホストの白質組織内の繊維神経索 (t r a c t s) に平行に向き (図20F)、そして大脳脳脚まで遠く突起したのが見られた (図20E)。

#### 同種移植片及び異種移植片間の比較：形態及び移植片－ホストの神経分布

成体ラット中の我々の皮質同種移植組織の全体的な外観は、皮質神経移植に関する以前の研究 (「Neural Grafting in the Mammalian CMS」 (Bjorklund、A. Stenevi、U.、eds.、Amsterdam、Elsevier) 中のDas、G. D. (1985) 「Development of Neocortical Transplants」101-123頁、; Gonzalez、M. F. 等 (1988) Exp. Neurol. 99:154-165; Soares、H. 及びMcIntosh、T. K. (1991) J. Neural. Transplant. & Plast. 2:207-220、Grabowski、M. 等 (1992) Exp. Neurol. 116:105-121; Isacson、O. 及びSofroniew、M. V. (1992) Exp. Neurol. 117:151-175) と一致した。AChE染色及びTH免疫組織科学により明白に示されたように、皮質同種移植片は求心性及び内在繊維系を維持できる一方で、蛍光路追跡結果は、皮質同種移

植片による皮質外組織の再神経分布のいかなる証拠も示さない。これらの結果は、以前の研究 (Gonzalez、M. F. 等 (1988) Exp. Neurol. 99:154-165; Isacson、O. 及びSofroniew、M. V. (1992) Exp. Neurol. 117:151-175) と一致する。

それに反して、ブタ皮質異種移植片は、同種移植片に類似した細胞構造を示す一方で、これらはまた、成体ホストに突起を伸ばす顕著な能力を示した。これら

の突起は、脳梁を越えてその下にある線条体へ、並び帯状束を経て脳梁の膝状湾曲構造を回って基底前脳中の中前脳束へ伸びた。内包及び大脳脚におけるCD-44免疫反応性により明白に示されたように、移植片由来の神経膠繊維は、より遠くの領域にさえ達することができた。これは、成体脳における同所的な胎児皮質移植片が、非皮質組織に神経分布し、白質領域 (t r a c t s) を越えて伸び、そして皮質下領域への宿主繊維神経索 (t r a c t s) 内に伸びているかなり多数の軸索を長距離伸ばすことができる最初の証拠である。加えて、同種移植片に関して以前報告されたこと (I s a c s o n、O. 及び S o f r o n i e w、M. V. (1992) Exp. Neurol. 117:151-175) に比べて、宿主皮質への移植片の神経分布は、同じ側及び反対側の両方で異種移植片により高められる。

意外な発見は、内包及び大脳脚への神経膠繊維の長距離の突起であった。これらの神経膠繊維由来の移植片は、胎児脳内の星状様神経膠繊維に相当する可能性がある。ニューロンの移動における構造神経膠及び星状ガイド繊維の役割、並びに発達中の脳における軸索案内は、よく記録されている (D o d d、J. 及び J e s s e l l、T. M. (1988)

Science 242:692-699; S i l v e r、J. 等 (1993) J. Comp. Neurol. 328:415-436; S t e i n d l e r、D. A. 等 (1993) Ann. Rev. Neurosci. 16:445-456)。膠芽細胞及び神経芽細胞の両方とも胎児皮質細胞懸濁液中に含まれるので、これらの領域 (t r a c t s) への移植片神経膠繊維の成長は、そうでなければ許容されない基質内への侵入及び成長を促進する成長促進基質を移植片軸索に与える可能性がある。

実施例VII：ブタにおける病原体を検出する方法

A. 病原体の徴候のためのブタ胎児サンプルの収集、処理、及び分析

ブタの直腸から糞便を手で取り出し、滅菌容器の中に置いた。被検物の約1.5cm直径の部分、10mlの0.85%食塩水中で十分に混合した。次に、この混合物を15ml円錐遠心管にワイヤメッシュの濾過器を通してゆっくりと

濾し、残っている糞便物質を沈殿させるために650 x gで2分間遠心分離する。沈殿物を取り除かないようにこの上清を注意深くデカントし、10%緩衝ホルマリンを9 mlの印まで加えた後、十分に混合する。この混合物を5分間静置させる。混合物に4 mlの酢酸エチルを加え、その混合物に蓋をし、逆さの位置で30秒間激しく混合する。次に、この蓋を通気させるために取り除き、次いで置き換える。この混合物を500 x gで1分間遠心分離する（4層が生じるはずである；酢酸エチル、残骸小塊、ホルマリン、及び沈澱物）。塗薬用棒を用いて、残骸小塊の縁を外す。溶媒容器に注ぐことにより、上三層を注意深く除く。管の側面に付着した残骸は、塗薬用綿棒を用いて取り除く。少量のホルマリンまたはデカント後管の中に残っている少

量のホルマリンのいずれかの中で、沈澱物を混合する。二つの別個の滴をスライドガラス上に置き、これに少量のLugol'sヨウ素を加える。両滴にカバーガラスをし、病原体の徴候、例えば、栄養体の原虫類シスト、腸内寄生虫の卵、及び幼虫に関して注意深く調べる。必要な場合、原虫類シストの同定はトリクロム染色により確かめられる。

#### B. ブタ細胞におけるヒト及び動物ウイルスの存在を検出するための共培養アッセイ

##### 材料

##### 細胞株

アフリカ緑ザル腎臓、(VERO)、American Type Culture Collection細胞株、(ATCC CCL81)、ヒト胚の肺繊維芽細胞、(MRC-5)、American Type Culture Collection細胞株、(ATCC CCL171)、ブタ腎臓、(PK-15)、American Type Culture Collection細胞株、(ATCC CRL33)、ブタ胎児精巣、(ST)、American Type Culture Collection細胞株、(ATCC CRL1746)

##### 培地、抗生物質、及び他の細胞、並びに装置

ウシ胎児血清、DMEM、ペニシリン10,000units/ml、ストレプトマイシン10mg/ml、ゲンタマイシン50mg/ml、モルモット赤血球、ニワトリ赤血球、ブタ赤血球、陰性コントロール（滅菌した細胞培養用培地）、陽性コントロール：VERO及びMRC-5細胞：弱毒化したポリオウイルス1型、(ATCC VR-192) 及

び麻疹ウイルス、Edmonston株、(ATCC VR-24)、PK-15及びST細胞：ブタインフルエンザA型、(ATCC VR-99)、ブタパルボウイルス、(ATCC VR-742)、及びブタの伝達できる胃腸炎(ATCC VR-743)。装置：組織培養用インキュベーター、逆位顕微鏡、生物学的安全キャビネット。

これらの材料を共培養アッセイ（広い範囲のヒト、ブタ、及び他の動物ウイルスを検出することのできる細胞株（VERO、MRC-5、PK-15及びST）に試験物を接種する工程）に用いることができる。Diagnostic Virology、1982 (Yale University Press、New Haven、CT、1982) 中のHsuing、G. D.、「Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals」。

#### 実験の考案及び方法論

各細胞株の計3フラスコ(T25)に、少なくとも1mlの試験物を接種する。陰性コントロールとして、各細胞株の3フラスコに適当な滅菌した細胞培養用培地も接種できる。陽性コントロールウイルスを各細胞株の3フラスコに接種する。吸収期間の後、接種材料を取り除き、全てのフラスコを35-37℃で21日間インキュベートする。ウイルス起源の細胞変性効果(CPE)の進展に関して、一週間当たり少なくとも3回全てのフラスコを観察する。ウイルスCPEを示す試験物で接種したあらゆるフラスコから採取を行う。

7日目に、各試験物のフラスコから上清の一部及び細胞を取り、少な

くとも1mlを各細胞株の3つの新しいフラスコの各々に接種する。これらの継代培養物を、35-37℃で少なくとも14日間インキュベートする。全てのフラスコを上記のように観察し、試験する。

7日目に、モルモット、サル、及びニワトリの赤血球を用いて接種後14日目に2-8℃及び35-37℃で、各試験物からのフラスコをウイルスの血液吸着(HAd)に関して試験もする。

21日目に、CPEが認められない場合、各フラスコからの上清の一部を取り、プールし、モルモット、サル、及びニワトリの赤血球を用いて2-8℃及び35-37℃で、ウイルスの赤血球凝集(HA)に関して試験する。ウイルスの同定は、特徴的なウイルスの細胞変性効果(CPE)及びHA HAd試験における反応性に基づく。

以下のようにして、ウイルスの細胞変性効果に関して試験サンプルを観察する。すなわち、最低21日のインキュベーションの間、各週少なくとも3回、ウイルスCPEに関して全ての培養物を観察する。インキュベーターから培養物を取り出し、少なくとも40xの倍率を用いて逆位顕微鏡を用いて観察する。100xまたは200x倍率を適切として用いる。細胞単層において、ウイルスCPEを含むいかなる異常でも認められる場合、またはいかなる試験物でも細胞単層の完全な破壊を引き起こす場合、これらのフラスコから上清及び細胞を取り、サンプルを同じ細胞株の追加のフラスコに継代培養する。継代培養するまで、サンプルを-60℃ないし-80℃で保存できる。7及び14日のインキュベーション後に、各サンプルで接種した全てのフラスコから上清及び細胞を取ることで、各試験物の2つの盲継代接種を行う。継代培養するまで、サンプルを-60℃ないし-80℃で保存できる。

血液吸着ウイルスを、以下の方法により検出する。すなわち、インキュベーションの21日目に、血液吸着ウイルスの存在を検出するために血液吸着試験を行う。試験物またはコントロールを接種した各フラスコから上清液を取り、プールする。モルモット、サル、及びニワトリの赤血球を用いてこれらの液体を試験する。赤血球凝集試験も、継代培養のインキュベーションの21日後に行う。生育

が認められた細胞株、ウイルスCPEの特徴、血液吸着反応、及び赤血球凝集反応に基づいて、ウイルス単離物を同定する。適当な場合には、有効なアッセイにおいて、この研究に用いた細胞株のいずれかがウイルスCPE、HA、またはHADを示す場合、その試験物はウイルス因子の存在に関して陰性と考えられる。

C. プタ細胞においてウイルスを検出するために用いた細胞株を調製及び維持するための方法

#### 材料

ウシ胎児血清 (FCS)、DMEM、ペニシリン10,000 units/ml、ストレプトマイシン10 mg/ml、ゲンタマイシン50 mg/ml、T25組織培養フラスコ、細胞培養用インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>、37℃)

#### 方法

接種及び移しかえを行う時は滅菌技術を行う。全ての接種及び移しかえは、生物学的安全キャビネット中で行う。最初の接種には10% FCSを、培養物の維持には5% FCSを、並びに500 mlの培地当たり5.0 mlのペニシリン/ストレプトマイシン及び0.5 mlのゲンタマイシンを加えることにより、培地を調製する。T25組織培養用フラ

スコの底を覆うように十分な培地を加える。このフラスコに所望する細胞株を接種し、細胞が80ないし100%融合するまで、37℃、5% CO<sub>2</sub>でインキュベートする。次に、これらのフラスコにウイルス (QCP25) を接種する。

D. 血液吸着 (HAD) 及び赤血球凝集 (HA) ウイルス検出試験に用いる赤血球 (rbc) 懸濁液の調製

#### 材料

リン酸緩衝食塩水 (PBS)、pH 7.2、モルモット赤血球ストック溶液、ブタ赤血球ストック溶液、ニワトリ赤血球ストック溶液、滅菌した使い捨て遠心管、15または50 mLの実験用遠心機

#### 方法

適量の赤血球 (rbc) をストック溶液から得る。約1000 x gで10分間の遠心分離により、これらの赤血球をPBSで3回洗浄する。まとめた赤血球

の各1に対してPBSを9の割合で加えることにより、10%懸濁液を調製する。この10% rbc 懸濁液を、一週間以下の間2-8℃で保存する。10% rbc 懸濁液の各1に対してPBSを19の割合で加えることにより0.5% rbc 懸濁液を調製する。各日の試験の前に、新しい0.5% rbc 懸濁液を調製する。

#### 赤血球凝集（HA）試験

赤血球凝集試験は、試験物中の赤血球を凝集する特性を有するウイルスを検出する試験である。Hsuing, G. D. (1982) Diagnostic Virology (Yale University Press, New Haven, CT); Stites, Daniel P及びTerr, Abba I, (1991), Basic a

nd Clinical Immunology (Appleton & Lange, East Norwalk, CT)。

#### 材料

試験物で接種したVERO細胞株、MRC-5のフラスコ、陽性及び陰性コントロールのフラスコからの上清、リン酸緩衝食塩水（PBS）、pH7.2、モルモット赤血球（GPRBC）、PBS中0.5%の懸濁液、ニワトリ赤血球（CRBC）、PBS中0.5%の懸濁液、ブタ赤血球（MRBC）、PBS中0.5%の懸濁液

#### 方法

全てのサンプル収集及び試験を認可された生物学的安全キャビネット中で行う。各型の赤血球の0.5%懸濁液を上記のように調製する。接種後少なくとも14日で、試験物のサンプルを接種した全ての細胞株においてHAを試験する。陽性及び陰性コントロールの培養物を各サンプルに対して含み、サンプルを集める前に単層が損なわれていないことを保証するために単層調べる。

試験物を接種した各フラスコから少なくとも1mlの培養液を取り、プールする。陰性及び陽性コントロール培養物からの1mlサンプルも取り、プールする。一組の管にサンプル番号及び加える赤血球の型（陽性及び陰性懸濁液を区別す

る)のラベルを張る。赤血球の型を区別するためにラックにラベルを張ることができる。各管に0.1mlのサンプルを加える。各管に0.1mlの適当な赤血球懸濁液を加える。各管をパラフィルムで覆い、十分に混合する。約30-60分のうちに陰性コントロールにおいて堅いボタン形の物(b u t t o n s)ができるまで、一組の管を2-8℃でインキュベートする。約30-60分のうちに陰

性コントロールにおいて堅いボタン形の物ができるまで、もう一組の管を35-37℃でインキュベートする。

赤血球の堅いボタン形の物の形成は、陰性結果を示す。赤血球での管の底の被覆は、陽性結果を示す。

E. (B及びC項において記述したような)細胞培養技術を用いたブタ細胞中のウイルスの検出において使用したフラスコから得た細胞懸濁液の蛍光抗体染色のために用いる方法

#### 方法

(B及びC項において記述した)細胞をT25フラスコから離すためにトリプシン消化し、トリプシン活性を中和するために十分な培地を加える。各顕微鏡スライドガラス上に少量の細胞懸濁液を置き、空気乾燥させる。各蛍光抗体用のスライドガラスを調製する。アセトン中に5分間浸すことにより、細胞を固定する。各蛍光抗体溶液を細胞を覆うように各スライドガラスの上に置き、これらのスライドガラスをインキュベーター内の給湿室中で36℃で30分間インキュベートする。次に、これらのスライドガラスをPBS中で5分間洗浄する。新しいPBS中で5分間洗浄を繰り返した後、DI水ですすぐ。

細胞を覆うように各スライドガラス上にエバンスブルー溶液を室温で5分間置くことにより、細胞を対比染色剤で着色する。次に、これらのスライドガラスをPBS中で5分間洗浄する。新しいPBS中で5分間洗浄を繰り返した後、DI水ですすぐ。これらのスライドガラスを次に空気乾燥させる。各スライドを蛍光顕微鏡下で調べる。感染に特有のいかなる蛍光封入体も、ウイルスの存在に関する陽性結果と考えられる。

## F. 菌血症ブタを特定するための方法

### 材料

嫌気性BMB寒天（5%ヒツジ血液、ビタミンK、及びヘミン [BMB/血液]、Iso Vitalexを有するチョコレート寒天、Sabaroudデキストロース寒天/Emmons、70%イソプロピルアルコールスワブ、ベタジン溶液、35-37℃の5%CO<sub>2</sub>インキュベーター、嫌気性血液寒天プレート、グラム染色試薬 (Columbis Broth Media)、好気性血液培養用培地（ビタミンK及びヘミンを有する嫌気性脳心臓注入物）、セプティチェック (septicheck) 培地系、ビティック (vitek) バクテリア同定系、層流フード、顕微鏡、並びにバクテロイデス及びバチルスストック

### 方法

層流フード下で、ブタから得られた血液の好気性及び嫌気性血液培養物用の瓶の蓋を70%イソプロピルアルコール、次いでベタジンで消毒する。好気性血液培養瓶からゴム栓及び蓋を取り除き、腎臓septicheck培地系を瓶につける。これらの瓶を5%CO<sub>2</sub>中35-37℃で21日間インキュベートし、バクテリア生育のいかなる徴候（すなわち、気泡、濁り、変色、またははっきり区別される集塊）に関しても毎日観察する。各瓶中5ccの滅菌食塩水からなる陰性コントロール、並びに好気性瓶中バチルス・サチリス (*Bacillus subtilis*) 及び嫌気性瓶中バクテロイデス・ブルガリス (*Bacterioides Vulgaris*) からなる陽性コントロールを用いる。バクテリアの成長の徴候が観察される場合、グラム染色を調製し、いかなるバクテリアまたは菌類の存在に関しても100x油液浸で顕微鏡で調べる。陽性の瓶を次に、Iso Vitalexを有するチョコレート寒

天プレート及びBMBプレートの両方の上に継代培養する。チョコレートプレートを35-37℃で5%CO<sub>2</sub>中24時間、そしてBMBを嫌氣的に35-37℃で48時間インキュベートする。グラム染色で明らかであるいかなる酵母または菌類も、Sabaroudデキストロース/Emmonsプレート上に継代培

養する。Vitek自動化系を、バクテリア及び酵母を同定するために用いる。菌類は、肉眼及び顕微鏡で見える特徴により同定する。21日の終わりに成長の何の徴候も見られない場合、グラム染色を調製し、バクテリア及び菌類の存在に関して顕微鏡で観察する。

陰性コントロール瓶中で成長がなく、陽性コントロール瓶中で成長があることは、有効な試験を示す。好気性及び嫌気性血液培養瓶の両方において成長のいかなる徴候もないこと、並びにグラム染色において見られる微生物が何もないことは、陰性の血液培養を示す。好気性または嫌気性血液培養瓶のいずれかにおける微生物の存在及び同定は、陽性の血液培養を示し、これは典型的に菌血症状態のためである。

#### 実施例VIII：パーキンソン病の患者へのブタ神経細胞の移植のためのプロトコル A. プロトコル

##### 患者含有規準

この研究のために選択された全ての患者は、7ないし20年間の進行したパーキンソン病にかかっている。全ての患者において、治療はつきているか、ひどい動作の緩慢さ、運動障害、及び著しいオン／オフ現象の徴候と共につき始めている。脳内移植のための核となる評価プログラム (Core Assessment Program for In

tracerebral Transplantation) (CAPIT) を患者を評価するために用いた。CAPITは、移植実験及びそれに続く患者の評価における患者の含有のための合意規準である。核となる規準は、臨床診断規準及びLドーパ反応性に基づく。パーキンソン病の診断は、この疾患の認識される徴候及び症状により明確に確立されなければならない。パーキンソン病は本来突発性でなければならず、腫瘍、感染、脳血管の疾患または外傷のためであってはならない。

パーキンソン病は、以下、すなわち、1) 動作の緩慢さ、2) 震え、3) 硬直、または4) 体位の不安定さのうち、少なくとも1つは震えまたは動作の緩慢さのいずれかである2つを示すことにより決定されるように突発性でなければなら

ない。患者は、CAPITにおいて定義される最も悪いオフにおいて測定された統一パーキンソン病評価尺度（Unified Parkinson's Disease Rating Scale）（UPDRS）得点より33%の改善を示すことにより、レドopa治療に対して明白に反応しなければならない。患者は、最適な薬物治療にもかかわらず、頻繁なオフ症状の出現、オンの間の無力にする運動障害または硬直（freezing）を含む難治性の症状を有さなければならない。患者はまた、磁気共鳴映像（MRI）で陰性でなければならない。

#### 患者排除規準

患者は、パーキンソン「プラス」症状により示されるような二次パーキンソン病の診断に基づいて排除される。痴呆は、付随するアルツハイマー病または広汎性レビ小体病の存在を示すことができ、そして痴呆は、薬物治療に対する耐性または患者を適切に調べる試験官の能力を妨げる

ので、22またはそれより少ないミニ精神状態得点（最大＝30）を有する患者は、痴呆を除くために排除される。鬱状態は、正確なUPDRS得点及び全体的な評価結果を得るのを妨げ得るので、重い鬱状態の患者を除くために、20またはそれより多い得点のハミルトン鬱病尺度得点を有する患者は除外される。患者はまた、いかなる長期間の追跡及び評価も妨げ得る著しい医学疾患の存在に基づき排除される。

#### 患者のパーキンソン病の評価

##### 規準－コア評価

UPDRSを主要な臨床評価尺度として用いて、患者を評価する。Hoehn及びYahr段階づけ（Hoehn and Yahr Staging）並びにCAPITによる運動障害評価尺度（Dyskinesia Rating Scale）評価系によっても評価を確立する。

回内回外試験、2点間の手／腕移動、指の敏捷さ、及び起立－歩行－着席試験を含む運動機能の定期試験により、評価を補足する。薬理学試験を、CAPITにおいて定義されたような明白なオフ状態における単一服用量レドopa試験と

して行う。患者及び家族は各評価会合の前一週間毎日日記をつけ、そして会合の各々はビデオテープに録画される。MRIを行い、そしてポジトロンエミッショントモグラフィー（PET）スキャンを行う。

パーキンソン病における日々の変化のために、患者は、確かな基準臨床状態を確立する前に1-3カ月の期間にわたって評価される。終日の観察を含む1ないし3つの別個の評価がある。評価期間の間、患者の薬物治療を一定にしておかなければならない。評価及び観察の実際の月数

は、この研究に入る前にどのくらい長く個々の患者がすでにL a h e y C l i n i cで精察されているかによる。

#### 手術後の評価

手術後3年間、患者を3カ月ごとに行うコア評価で追跡する。追跡PETスキャンを、手術後6-8カ月目並びに2年及び3年の間に行う。

手術前後のビデオテープを独立した試験官が評価する。これらの試験官は、手術に対する患者の時間及び録画に関して知らされない。

#### 移植される細胞の型、数、及び濃度

胎児中脳細胞懸濁液を、E26-28年齢の胎児からのブタ胚組織の腹面中脳の吻側半分の解離物から調製する。定期的に交尾させ超音波検査により確認した妊娠しているYorkshireブタを、Turfts University School of Veterinary Medicine (North Grafton, Massachusetts)での標準的な獣医学方法に従って安楽死させる。これらの胎児からの腹面中脳を、顕微鏡案内の下で注意深く解離し、次いでプールし、インキュベートし、そして移植用の細胞懸濁液を調製するためにトリプシン消化する。細胞をマイクロリットル当たり50,000細胞の濃度に調製し、生存度を評価する。片側の被殻中の6つの定位固定標的の各々で40マイクロリットル容量までの細胞懸濁液を移植する。このようにして、計240 $\mu$ lまでを注入する。これらの細胞の10%が移植後に生き残ることが、ラットの実験において見いだされている。それ故、約10%が中脳のドーパミン作動性細胞であるといわれた約12 x 10<sup>5</sup>の生き残っている細胞を得る

ために、 $12 \times 10^6$ までの細胞を注入する (Brundin, P. 等 (1985) Brain

Res. 331:251-259; Dunnett, S. B. (1994) 「Improving Viability of Nigral Grafts in Transplantation in Neurodegenerative Disease」第5回神経移植国際シンポジウム Chaterly-Malabry, Paris. AGON. S. 27)。結果として、 $12 \times 10^4$ の細胞を補う。進行したパーキンソン病において、患者は、通常、被殻ドーパミンを提供する  $25 \times 10^4$ のドーパミン作動性細胞の少なくとも80-90%を失っている。

#### 移植部位及び方法

前部被殻中の2つの部位及び後部被殻中の4つの部位を、ブタ神経細胞の移植のための標的とする。MRI誘導技術を用いて、全ての患者に片側だけを定位固定した細胞移植を行う。この方法のために、CRW定位固定フレームを用いる。この装置は、通常、生検または機能的な切除治療のための脳における組織の正確な標的設定のために用いられる。用いるカニューレは、Diacrin, Inc.、Charlestown, MAで開発され、Burlington, MAのRadionics Companyにより製造された。カニューレの外径は1.0 mmであり、内部の寸法は0.5 mmである。マイクロマニピュレーター装置を定位固定フレームローライザーと連結して用いる。被殻中の特定の位置を標的とするために研究を行うMRIスキャナーへ患者を連れて行く。次に、この患者を手術室へ連れて行き、滅菌状態の下で、右前頭皮に3 cmの切開を行う。正中線の横2 cm及び冠状縫合の前1 cmの頭蓋冠に穿頭孔をあける。カテーテルの安全及び円滑な挿入のために、

凝固剤を用いて髄膜を開く。カテーテルを、先に計算された被殻中の標的へ置く。患者は、この全手続きの間起きていて、頭皮において皮下にリドカイン及び静脈内にいくつかの穏やかに作用する鎮痛剤だけを与えられる。脳には痛みの受容

体がないので、カテーテルの通過及び移植手続きは無痛である。移植手続きの最後に、切開をナイロン縫合糸で閉じ、滅菌した包帯をつけ、そして、定位固定フレームを取り除く。患者を回復室へ連れて行き、24時間密接に観察する。手術後1日目に、患者は食事をすることを許され、通常の活動を始める。手術後2日目にもし患者が良好な状態にあれば、密接な追跡をして退院させる。

#### 免疫抑制

患者に経口でシクロスポリンを与える。シクロスポリン治療の主要な有害反応は、増加する感染の危険、腎機能不全、高血圧、多毛症、及び目やに（gum）の過形成である。最初のシクロスポリン服用量は、 $15\text{ mg/kg}$ の単一服用量として移植の12時間前に与えられる。14ないし $18\text{ mg/kg}$ の毎日の服用量を用いる。手術後2週間、シクロスポリンを、 $5-10\text{ mg/kg}$ の維持服用量まで週当たり5%ずつ減らす。血液シクロスポリンレベルをモニターし、血液学的及び腎機能の頻繁な検査を各患者において行い、それに従って服用量の修正をする。

#### C. 評価プロトコル

##### パーキンソン病の評価

患者を、先に述べたようなパーキンソン病の程度に関して評価する。この安全性研究の点において、移植された細胞の不都合な副作用に関して主に患者をモニターする。

#### 実験室試験

血清クレアチニン、BUN、肝臓の酵素、血清ビリルビン、全血球計算及び血小板機能、赤血球、及びシクロスポリンレベルにより、肝臓及び腎臓の機能を定期的に評価する。

#### MRI スキャン

各患者に、手術前後のMRI スキャンを行う。これらのMRI スキャンは、手術前3カ月以内及び細胞の外科移植後7日目に再び行う。追跡MRIを6カ月目に再度行う。

#### 6- [ $^{18}\text{F}$ ] フルオロ-デオパ（FD）でのPET 映像

手術前のPETスキヤニングを、移植の前3カ月間以内、並びに手術後9及び18カ月目に再度行う。患者は一晩断食し、全ての抗パーキンソン病薬物治療をPET映像の前12時間はやめる。PC-4096スキヤナー (Scanditronix AB, Sweden) を用いて、PET研究を行う。この装置に特徴的な手順は、文献 (Roto Kops, F. 等 (1990) J. Comput. Assist. Tomogr. 14: (3): 437-445) に詳細に記述されている。PC-4096カメラの一次映像パラメーターは、in-planeで、6.0 mm FWHMの垂直方向の解像度、6.5 mm分割の連続したスライス、及び $5.000 \text{ cps}/\mu\text{Ci}$ の感度である。7 mm FWHMのin-plane解像度に対する通常の傾斜後方映写アルゴリズムを用いて、全ての画像を再構築する。<sup>68</sup>GEを含む回転しているピン源を用いて得た伝達データから、減衰修正を行う。Luxenにより記述された方法 (Luxen, A. 等 (1990) Appl Radial Isot. 41: 275-281) により、FDを放射化学純度>95%、比活性 $=400 \text{ mCi}/\text{mmole}$ に調製する。

レーザーの照準を合わせて、個々に製作したヘッドホルダー (Tru Scan Image Inc., Annapolis, MD) 中スキヤナーに患者を位置する。ガントリー角度を、眼窩外耳孔線に平行であるように調整する。全ての研究を薄暗い照明中で開かれた目及び最少の聴覚刺激で行う。

脱炭酸反応を抑制するために、カルビドーパ (200 mg) を各トレーサー注入の1時間前に経口で与え、FD (5-10 mCi) を映像の開始時にボラスとして静脈内に注入する。注入後すぐに始まる12の10分の連続したエミッションスキャンを得る。

全血サンプル (1 ml) を以下のように、すなわち、トレーサー注入の間に始まる最初の1分の間に8サンプル、次の1分の間に4サンプル、3、4、5、7、12、及び17分に1サンプル、並びに25から115分までに10分ごとに1サンプル、橈骨動脈カテーテルから取り出す。この血液を遠心分離し、全血漿放射能を0.5 ml サンプルについて測定する。バッチ接触アルミナ抽出法 (C

han、G. 等 (1991) Life Sci. 50:309-318) により 2.5、5、7、10、15、20、30、45、60、75、90、及び120分に取り出した5mlのサンプルから、FDの血漿代謝産物 (3-O-メチル-FD) を測定する。

#### データ分析

高いカウント密度の合成画像を作るために、FD注入後60から120分に得られた画像をまとめる。以下のようにして、目的の領域 (ROI's) をこの画像から引き出す。すなわち、一つの円形のROI (直径8MM) を各尾状核上での検査により位置し、平均ROI活性を最大

にするために合成画像上で調整する。3つの円形のROI's (直径8MM) を各被殻の軸に沿って置き、同様に調整する。3つのバックグラウンドの円形ROI's (直径20MM) を側頭-頭頂皮質の各側に置く。尾状核及び被殻がはっきりと見える全てのスライスに対して、この手順を繰り返す。次に、ROI'sの完全な組を全ての時間枠にわたって折り重ねる (replicated)。各枠に対して、右及び左の尾状核、右及び左の被殻、並びにバックグラウンドに対して別個の測定値を生じるために、類似した組織のROI'sを平均する。単一の患者に対する各スキャンを分析するために、同じ組のROI'sを用いる。必要な時は、再配置を補正するために位置を調整する。

線条体活性からバックグラウンドを引くことにより、線条体の時間活性データにおけるFD及び3-O-メチル-FDの修正を行う (Martin、W. R. W. 等 (1989) Ann Neurol 26:535-542)。FDの線条体蓄積に対する速度定数を、Patlak及び同僚により記述された図式的な方法 (Martin、W. R. W. 等 (1989) Ann Neurol 26:535-542; Patlak、C. S. 等 (1983) J. Cereb Blood Flow Metab. 3:1-7; Patlak、C. S. 等 (1985) J. Cereb Blood Flow Metab. 5:584-590) により計算する。この分析を、注入後20から120分に得たデータの全てのROI'sに対して行う。合成画像上のバックグラウンドに対する標的の比

率（比率法）としても、スキャンを分析する。ROI'sの領域に対する修正後、線条体活性をバックグラウンド活性で割る。

同等物

当該技術分野において熟練した者は、通常の実験法だけを用いて、本明細書に記述された本発明の特定の態様の多数の同等物を認めたりまたは確認することができる。そのような同等物は、以下の請求の範囲により含まれると解釈される。

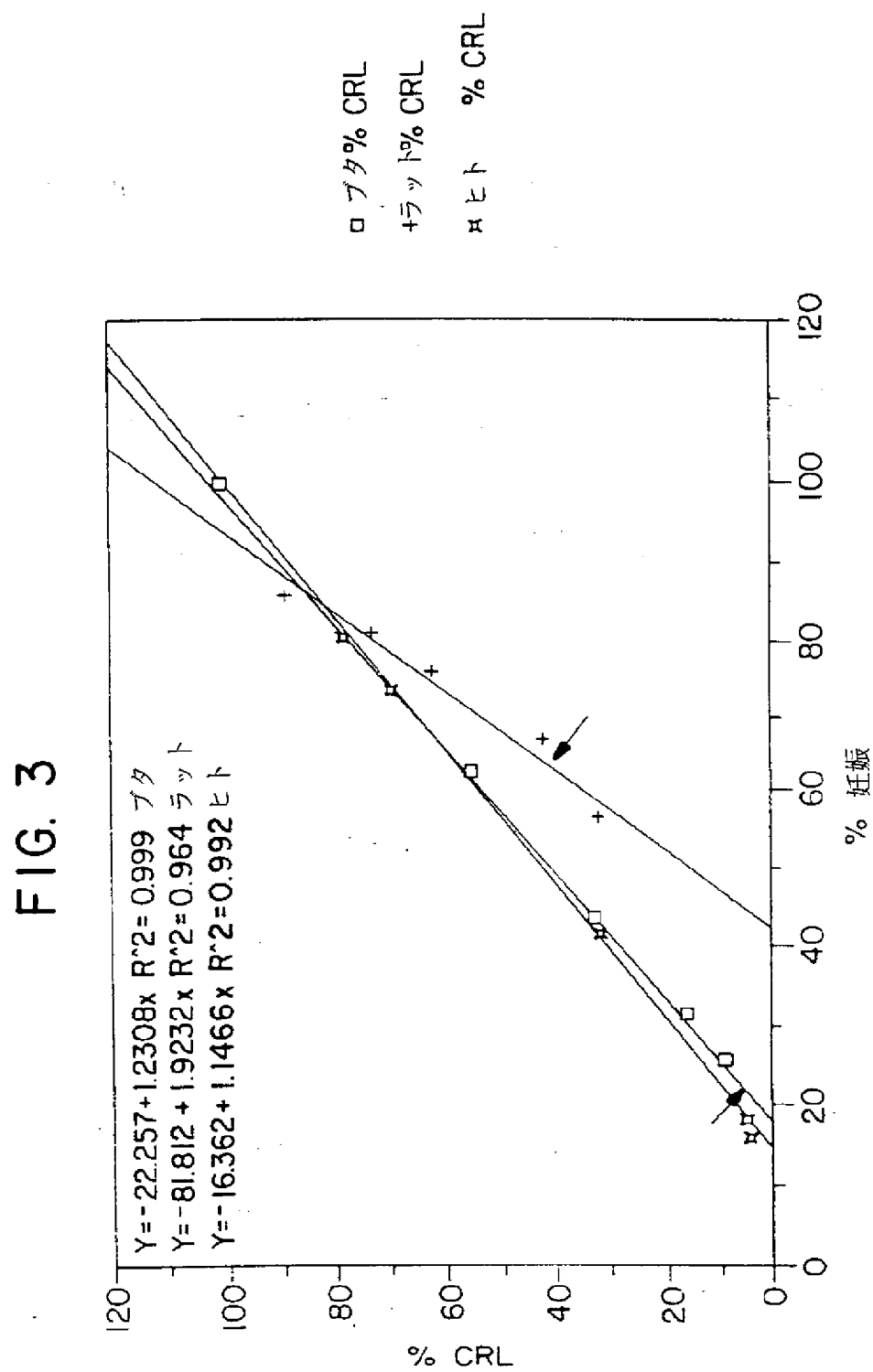
【図1】

FIG.1

ブタ番号	妊娠期間（日）	胎児 CRL (mm)	生存率
3	35	35	< 10%
5	27	22	73%
6	32	30	20%
9	26	18	81%
14	28	25	76%
15	26	20	85%
20	28	25	77%



【図3】



【図4】

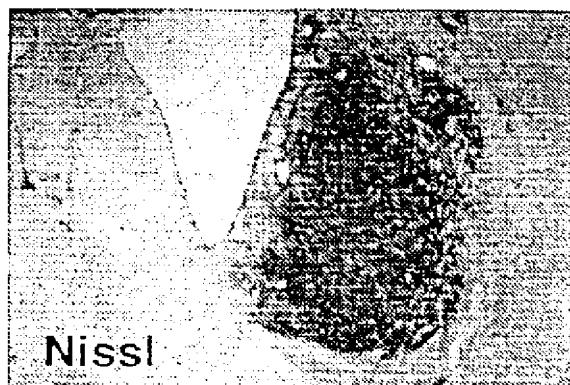


FIG.4A



FIG.4B

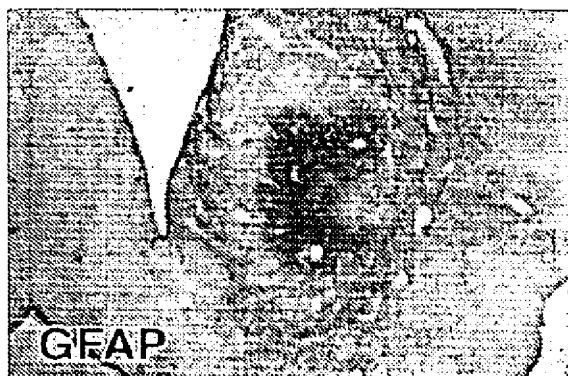


FIG.4C

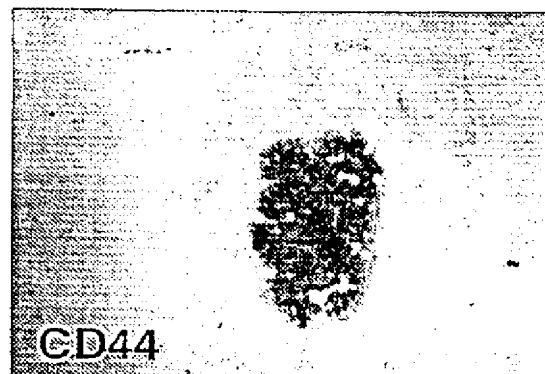


FIG.4D



FIG.4E

【図5】



FIG.5A

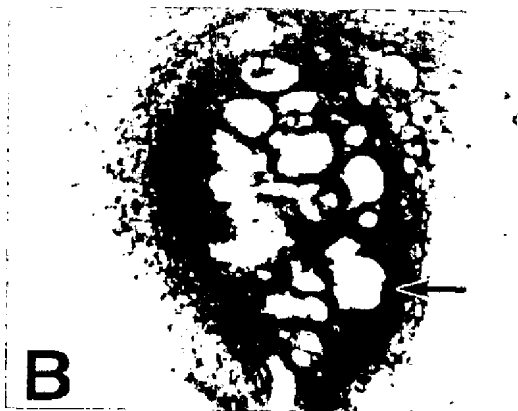


FIG.5B

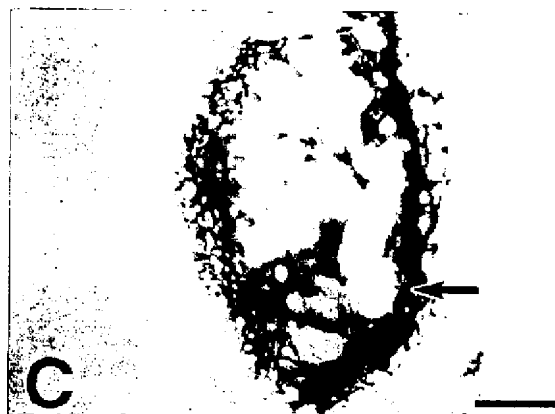
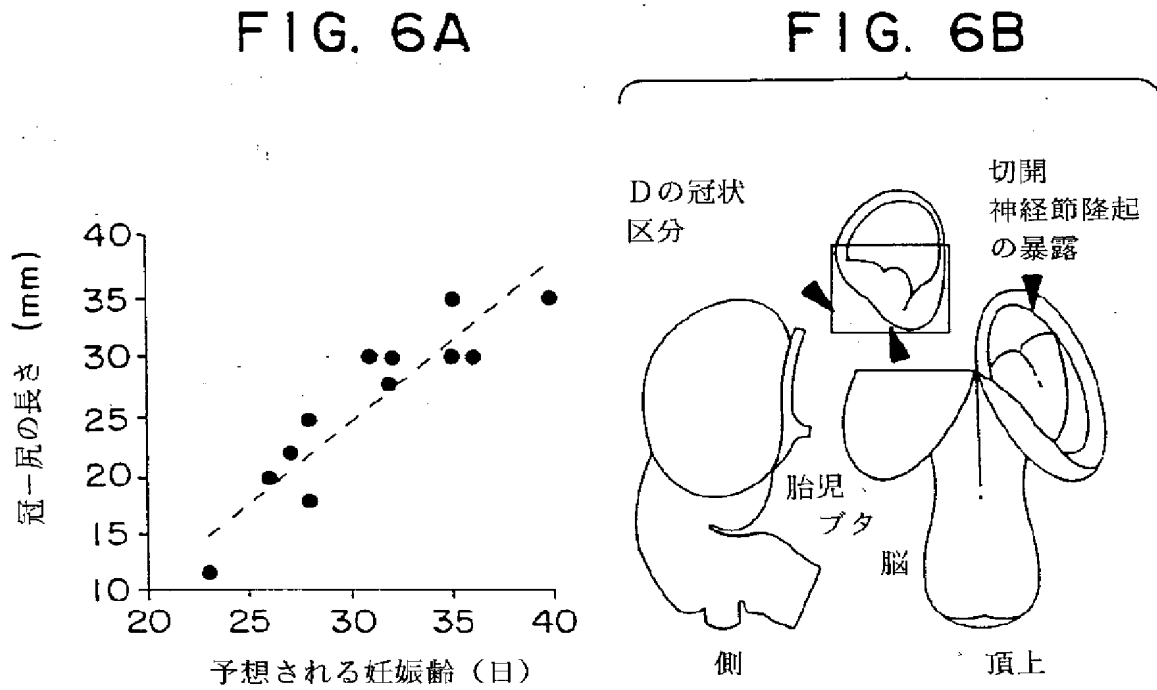
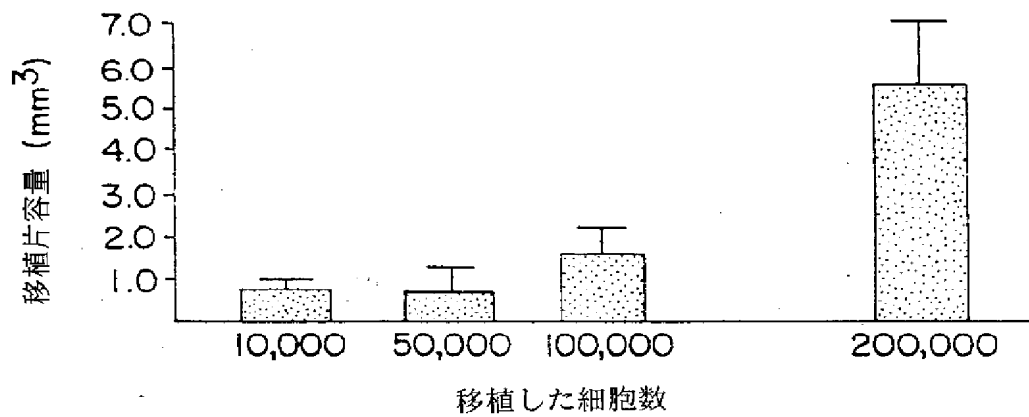


FIG.5C

【図6】



【図7】

**FIG. 7C**

【図6】

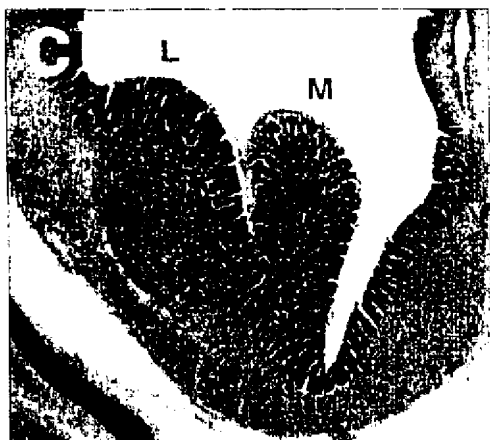


FIG.6C

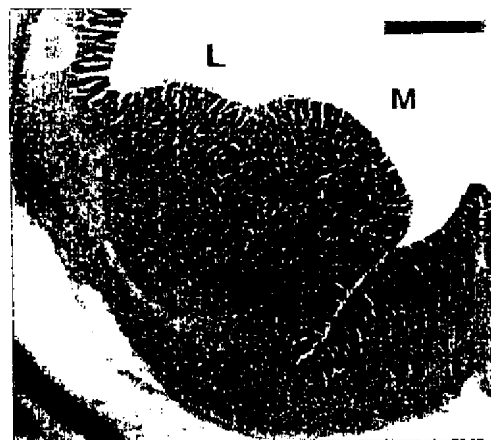


FIG.6D

【図7】



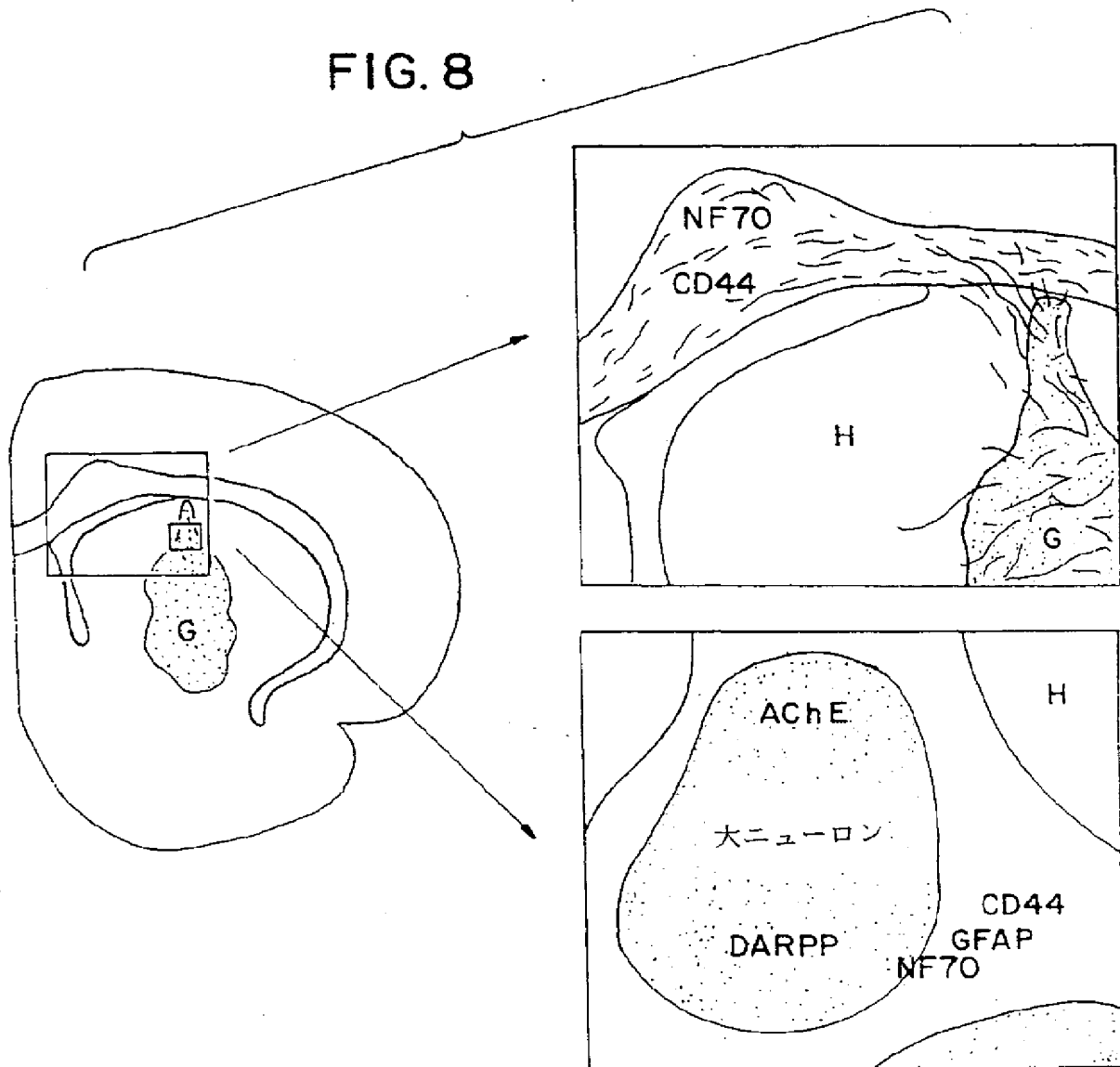
FIG.7A



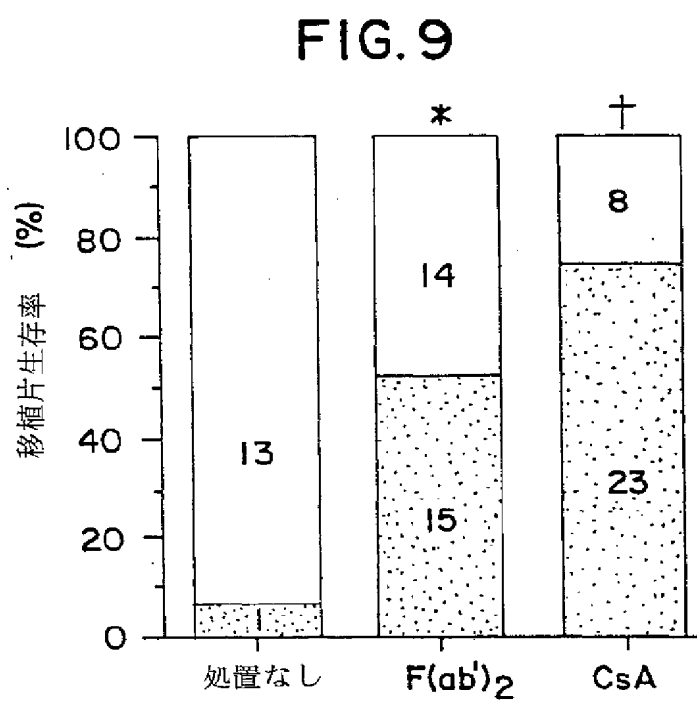
FIG.7B

【図8】

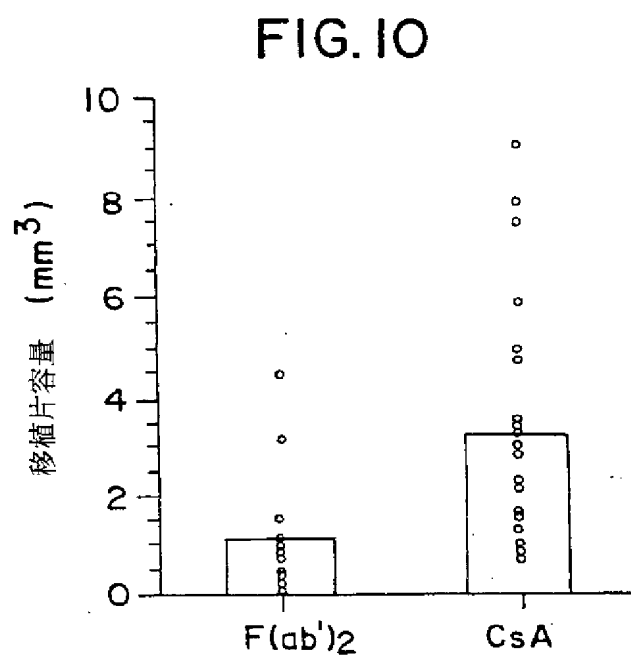
FIG. 8



【図9】



【図10】



【図11】

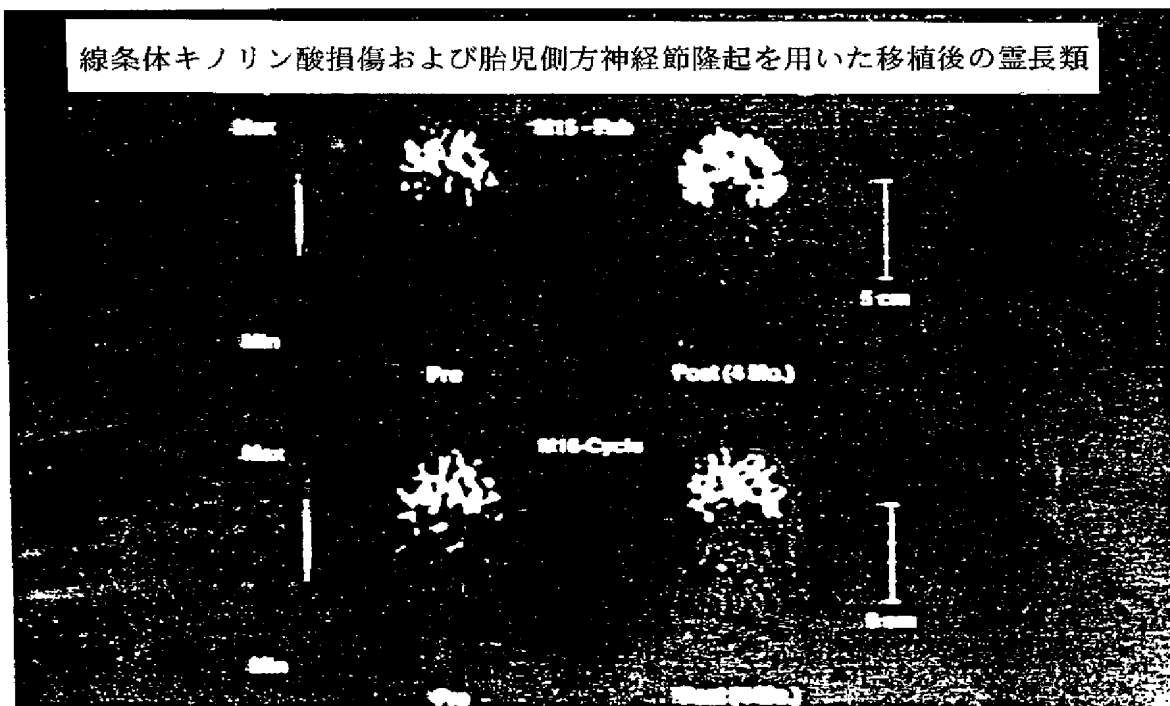
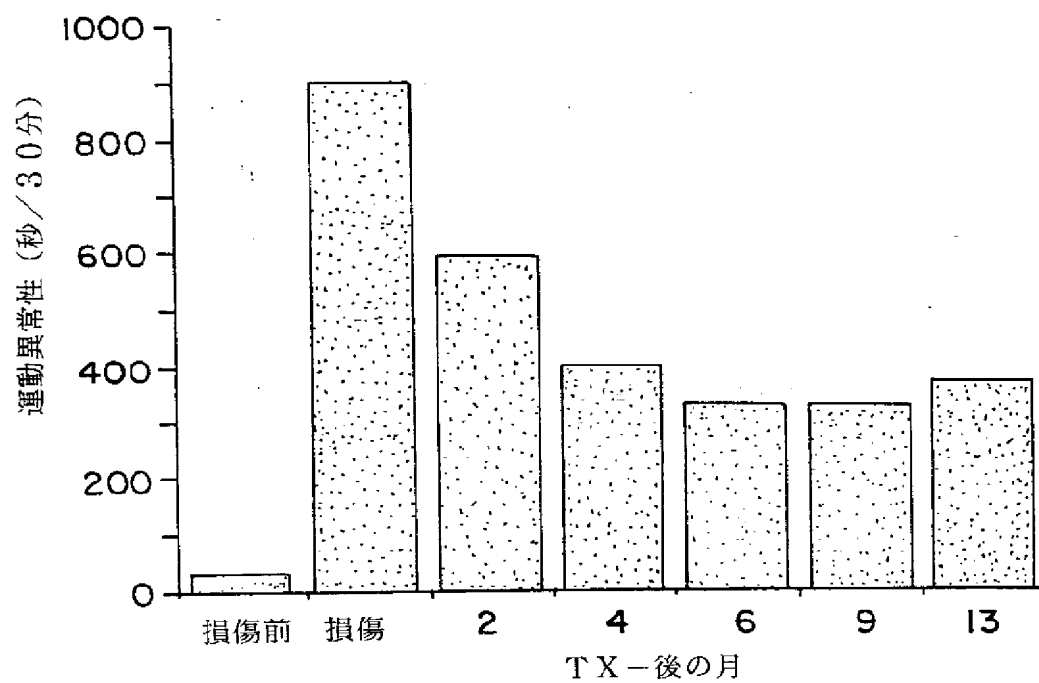


FIG. 11

【図12】

FIG.12



【図13】

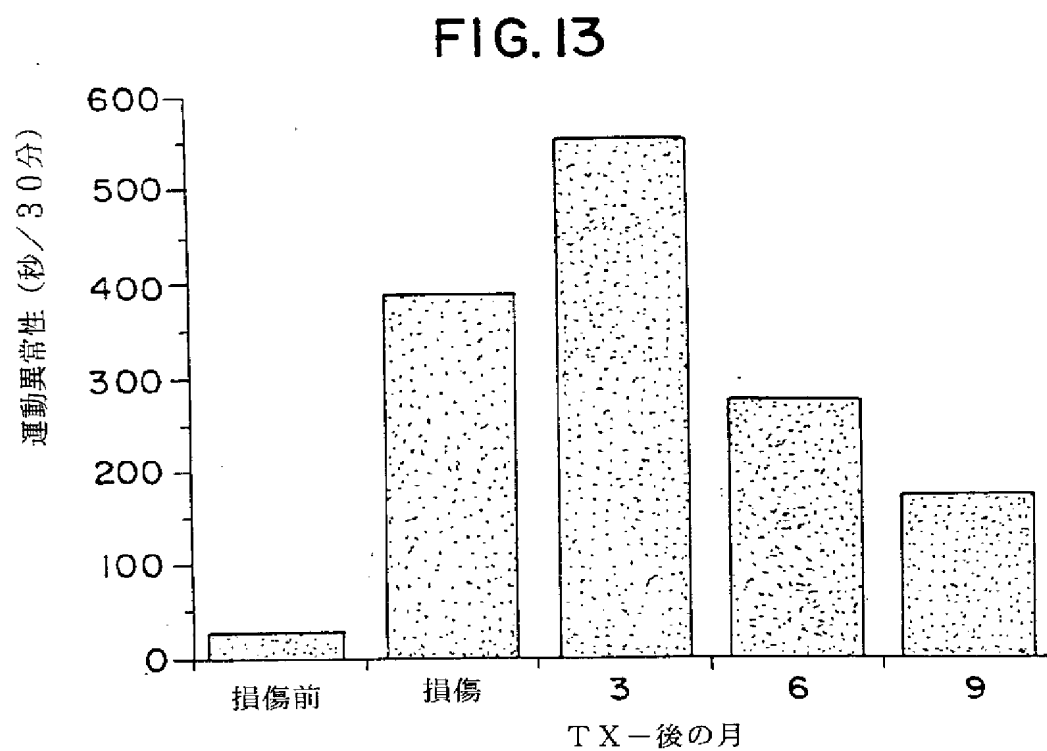
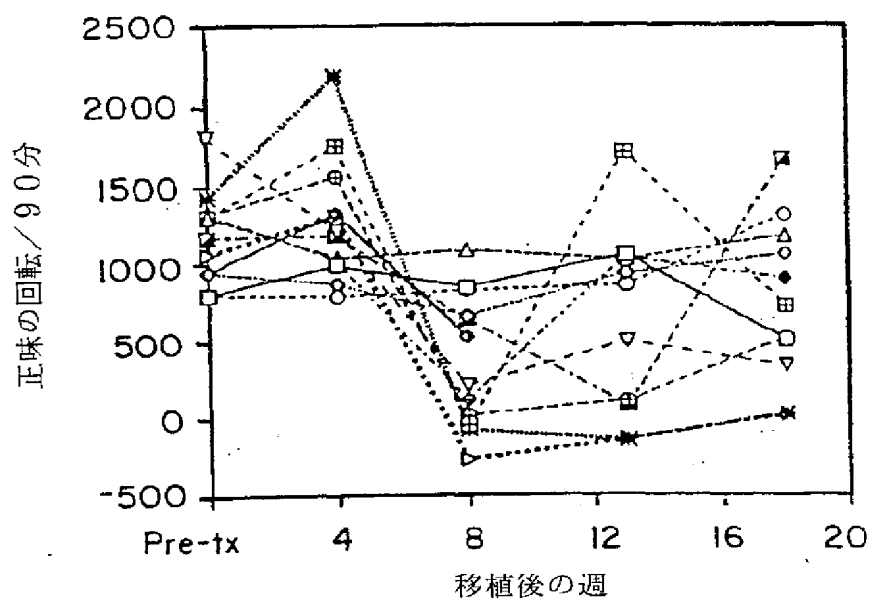
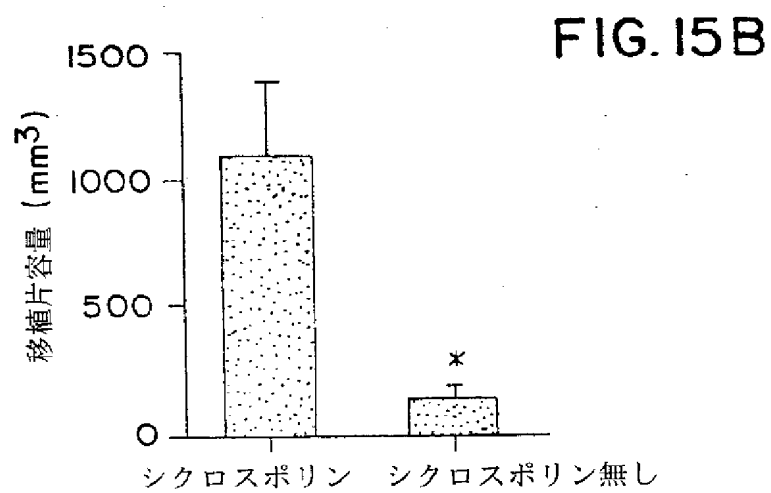
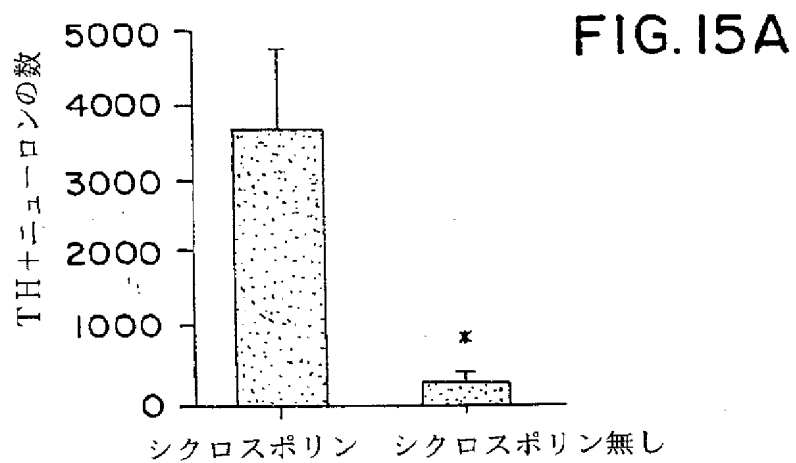


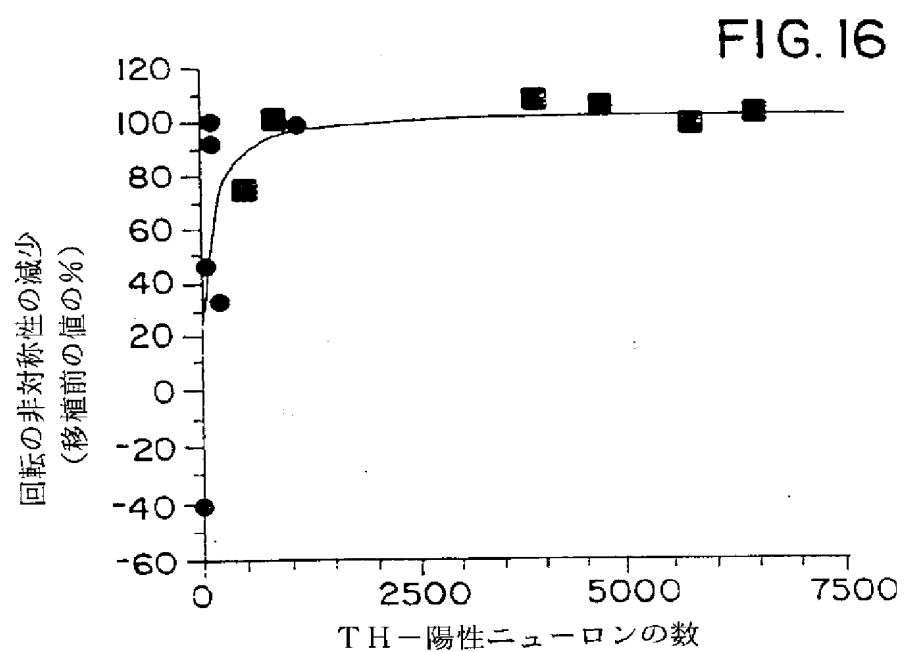
FIG.14A



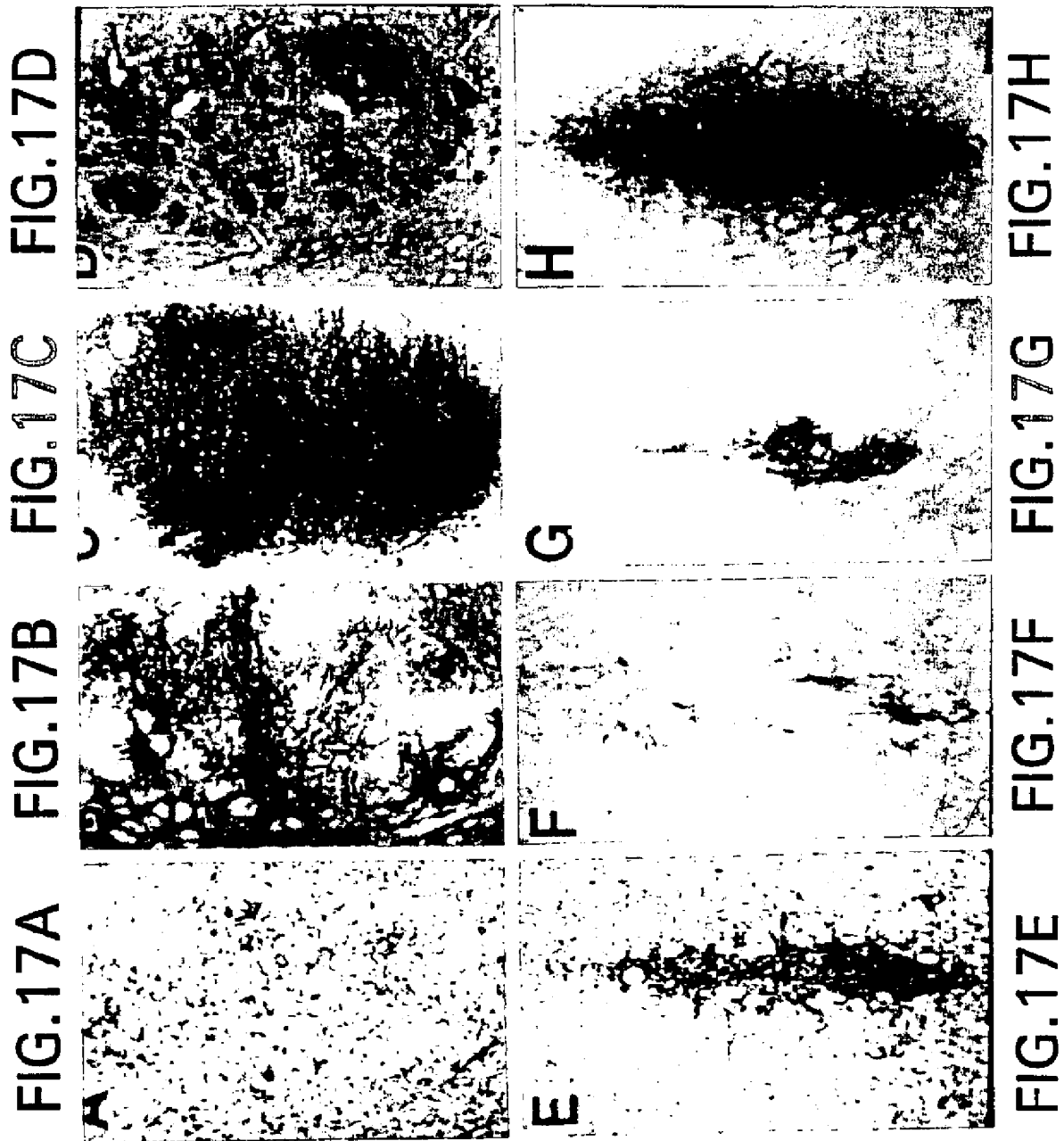
【図15】



【図16】

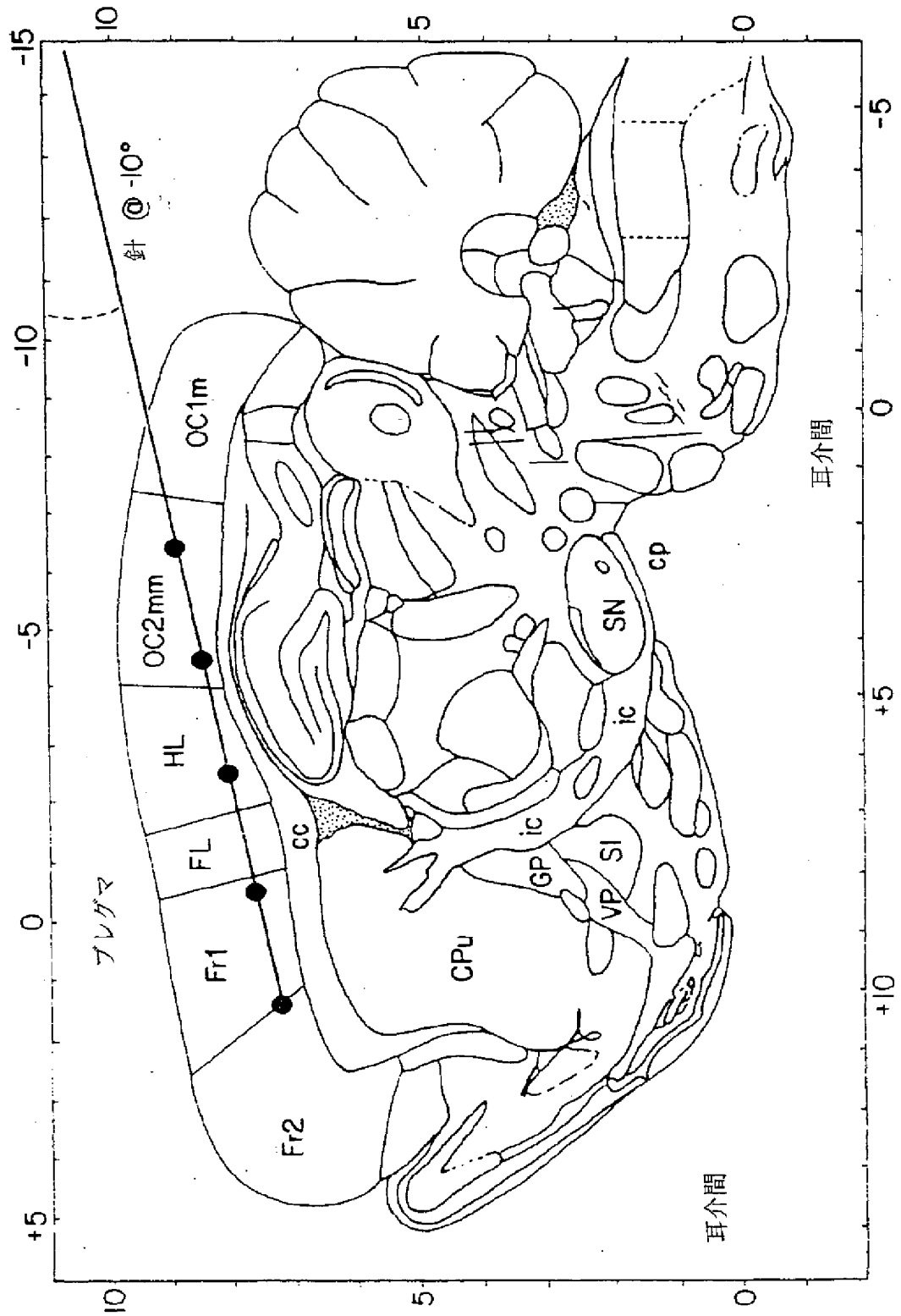


【図17】



【図18】

FIG. 18A



【図18】



FIG.18B

FIG.18C

【図19】

FIG.19A



FIG.19B



FIG.19C

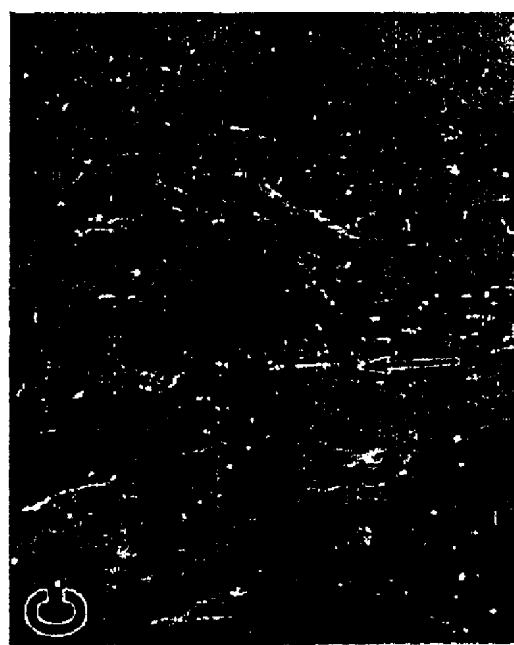
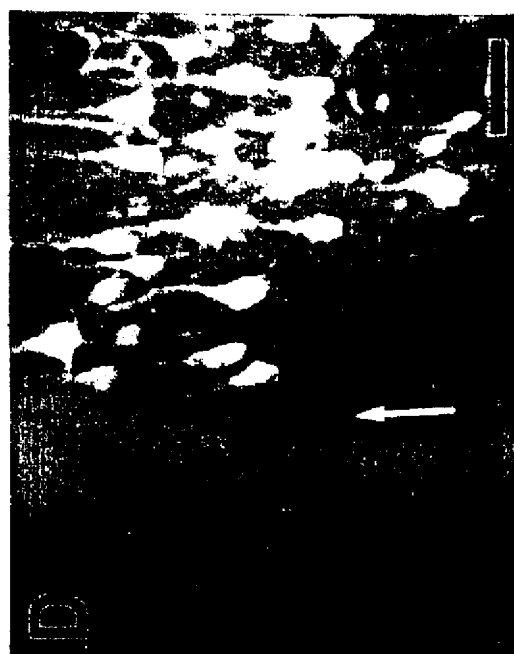


FIG.19D



【図20】

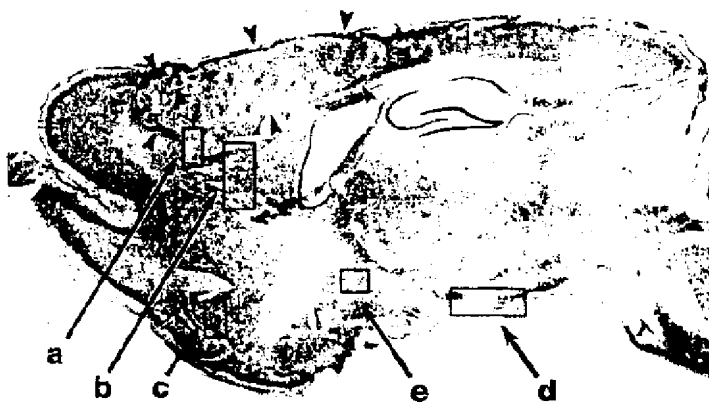


FIG. 20A



FIG. 20B

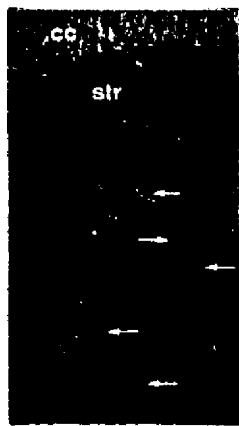


FIG. 20C

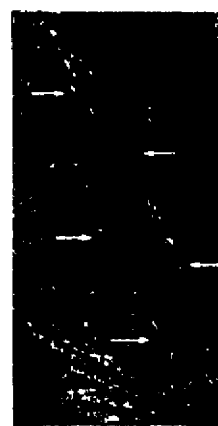


FIG. 20D



FIG. 20E



FIG. 20F

【図 21】

FIG.21A



FIG.21B



【図22】

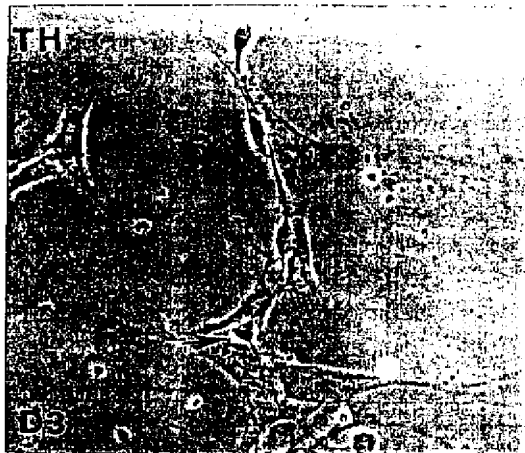


FIG.22A



FIG.22B



FIG.22C

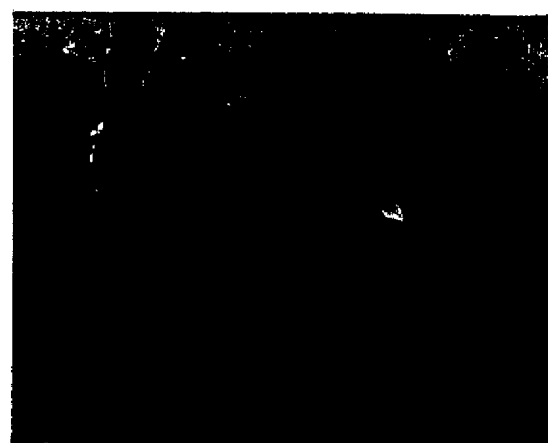


FIG.22D

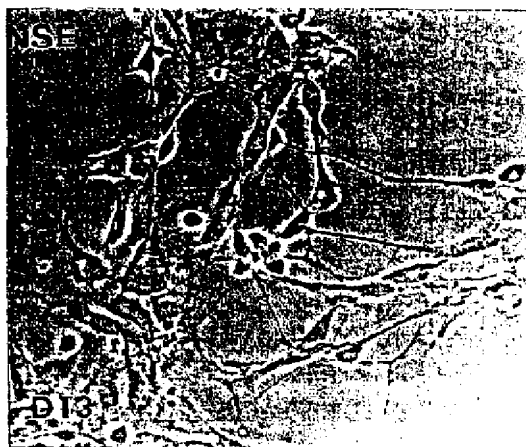


FIG.22E



FIG.22F

【図22】

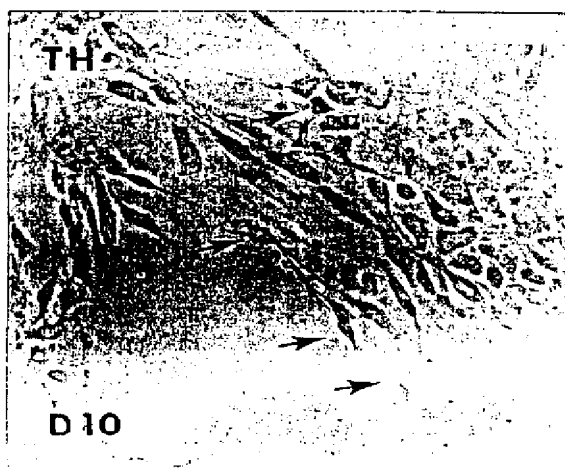


FIG.22G

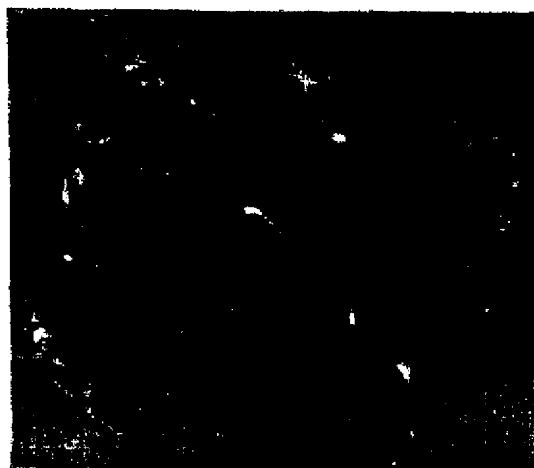


FIG.22H



FIG.22I



FIG.22J

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Classification No. PCT/US 95/14453		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N5/06 A61K35/30 A61K38/13 //(A61K38/13,35:30)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCIENCE, vol. 252, no. 5013, 21 June 1991 WASHINGTON, DC, USA, pages 1700-1702, D. FAUSTMAN ET AL. 'Prevention of xenograft rejection by masking donor HLA class I antigens.' cited in the application see abstract ---	1-15, 22-34, 41-54, 56-81, 88-96
A	CELL TRANSPLANTATION, vol. 3, no. 3, May 1994 NEW YORK, NY, USA, page 216 B. HERTEL-WULFF ET AL. 'Long term survival of pancreatic islets in diabetic monkeys.' see abstract 20 ---	1-15, 22-34, 41-54, 56-81, 88-96
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  2 April 1996		Date of mailing of the international search report  23 April 1996
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Nooij, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 95/14453

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,92 04033 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 19 March 1992 cited in the application  see examples see claims ---	1-15, 22-34, 41-54, 56-81, 88-96
A	EXPERIMENTAL NEUROLOGY, vol. 130, no. 1, November 1994 NEW YORK, NY, USA, pages 151-167, XP 000566922 T. DEACON ET AL. 'Cytoarchitectonic development, axon-glia relationships, and long distance axon growth of porcine striatal xenografts in rats.' see abstract ---	1-16,18, 21-35, 37, 40-82, 84,87-96
P,X	NEUROSCIENCE, vol. 65, no. 4, April 1995 OXFORD, GB, pages 983-996, XP 000566923 P. PAKZABAN ET AL. 'A novel mode of immunoprotection of neural xenotransplants: Masking of donor major histocompatibility complex class I enhances transplant survival in the central nervous system.' see the whole document -----	1-15, 22-34, 41-54, 56-81, 88-96

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US95/14453

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 59-90 and 96  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Remark: Although these claims are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.  
PCT/US 95/14453

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9204033	19-03-92	US-A- 5283058	01-02-94
		AU-B- 656150	27-01-95
		AU-B- 8510491	30-03-92
		CA-A- 2090009	01-03-92
		EP-A- 0550482	14-07-93
		JP-T- 6503810	28-04-94
-----			

---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
A 6 1 K 38/16	A A M	A 6 1 K 45/00	
38/22	A A F	G 0 1 N 33/53	N
38/27		A 6 1 K 37/24	A A F
38/28		37/04	A A M
38/44		37/36	
45/00		37/50	
G 0 1 N 33/53		37/26	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(72)発明者 アイザクソン, オール  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02138ケンブリッジ・ファイヤーウエザーストリート58

(72)発明者 デインスモア, ジヨナサン  
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州02146ブルックライン・ホワイトブレイス28